

**NEOLI LUCYSZYN**

**APLICAÇÃO DE GALACTOMANANAS COMO SUBSTITUTAS  
PARCIAIS DO ÁGAR NO CULTIVO DE TECIDOS VEGETAIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Processos Biotecnológicos, área de concentração:  
Agroindústria, Setor de Tecnologia, Universidade  
Federal do Paraná, como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Processos  
Biotecnológicos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski  
Co-orientadora: Profa. Dra. Marguerite Quoirin

CURITIBA  
2004

## **SEJA VOCÊ MESMO**

Dê sempre o melhor... e o melhor virá.

Às vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas...

**Perdoe-as assim mesmo.**

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta e interesseiro...

**Seja gentil assim mesmo.**

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros...

**Vença assim mesmo.**

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo...

**Seja honesto e franco assim mesmo.**

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra...

**Construa assim mesmo.**

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja...

**Seja feliz assim mesmo.**

O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã...

**Faça o bem assim mesmo.**

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante...

**Dê o melhor de você assim mesmo.**

E veja você que, no final das contas,

**É entre você e Deus... Nunca foi entre você e eles!!!**

Madre Tereza de Calcutá

À Deus,  
sempre presente em minha vida, e que  
colocou em meu caminho algumas  
pessoas maravilhosas...

Todas as palavras serão poucas para  
agradecer a quem sempre está ao meu  
lado, que com paciência e dedicação,  
não mediu esforços para mais esta  
conquista...

À você, Sérgio Fernando,  
Com todo o meu amor.

À professora Maria Rita,  
que me orientou com amizade e  
competência, por compartilhar seus  
conhecimentos e experiências, e pelo  
apoio e incentivo nos momentos mais  
difíceis...

## AGRADECIMENTOS

A jornada se torna mais amena quando encontramos mãos amigas que se estendem em nossa direção. A todos que souberam dar sua parcela de contribuição e à amizade sincera, cultivada durante nosso convívio, MUITO OBRIGADA!

Aos meus pais, Estanislau (*in memoriam*) e Leocádia, que sempre mostraram o caminho, onde os ideais são alcançados com humildade, dedicação e amor;

Aos meus irmãos Nelson, Nélia e Nereu, e sobrinhos Jú, Guigo e Gabi por fazerem parte de minha vida;

Aos meus sogros, Leovanil e Leonice, por me acolherem como filha, pelo carinho e apoio nesta importante etapa de minha vida;

À professora Dra. Fany Reicher, pelo incentivo inicial que deu origem a este trabalho e pela disponibilização do reômetro HAAKE;

À professora Dra. Marguerite Quoirin pela oportunidade e sugestões;

À professora Dra. Luciana F. Ribas, pelas primeiras fotografias, sugestões e correções deste trabalho;

Ao professor Dr. Brás Heleno de Oliveira, pelas sugestões e correções deste trabalho;

À Nery Nishimura de Lima pela amizade, troca de idéias e sugestões, que foram de grande importância durante a execução deste trabalho;

Ao Rilton A. Freitas pelas conversas agradáveis, troca de idéias e pela ajuda na determinação da massa molar das galactomananas;

À Sandra Martin pela amizade e pelas primeiras orientações no uso do reômetro HAAKE;

Às alunas de Iniciação científica, Odivânia e Milena, pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos demais colegas do Laboratório de Biopolímeros, pelas risadas, desabafos e conversas científicas: Adriana, Ana Cristina, Celina, Charles, Cristiane, Francine, Gustavo, Helena, Jerry, Juliana, Lucy, Miryam, Tatiane e Wagner;

À Andréia, técnica do Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais, pelas análises de cromatografia gasosa;

Ao Professor Henrique Soares Koehler e à aluna do curso de estatística Renata Remer Mancia, pela ajuda nas análises estatísticas preliminares;

A EMBRAPA e seus funcionários pelo uso da biblioteca;

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pela disponibilização de suas instalações e equipamentos;

Ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química pela disponibilização das instalações da usina Piloto e do equipamento para a determinação do teor de proteína pelo método de Kjeldahl;

Ao Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná pela disponibilização de suas instalações e equipamentos;

Aos colegas do Laboratório de Micropropagação Vegetal da Universidade Federal do Paraná;

Aos funcionários da Universidade Federal do Paraná;

À Capes, por seis meses de bolsa-auxílio parcial.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
 2. OBJETIVOS.....	 5
2.1. Objetivos gerais.....	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
 3. REVISÃO DA LITERATURA.....	 6
3.1. Ágar e galactomanana.....	6
3.1.1. Goma Guar - <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> (L.) Taub.....	9
3.1.2. Cássia - <i>Cassia fastuosa</i> Willd Benth.....	11
3.1.3. Leucena - <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.....	12
3.1.4. Propriedades reológicas e interações com galactomananas.....	15
 4. ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO.....	 19
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1.1. Fontes de Polissacarídeos.....	20
4.1.2. Extração de Galactomanana.....	20
4.1.3. Análises químicas das amostras de galactomanana.....	22
4.1.3.1. Determinação de açúcar total.....	22
4.1.3.2. Determinação do teor de proteína.....	22
4.1.3.3. Determinação da composição monossacarídica.....	23
4.1.3.4. Análises de HPSEC-MALLS.....	23
4.1.4. Preparo das misturas para as análises reológicas e testes de cultivo <i>in vitro</i> .....	24
4.1.5. Reologia.....	24
4.1.5.1. Medidas relativas não-oscilatórias .....	24
4.1.5.2. Medidas dinâmicas absolutas não-oscilatórias .....	25
4.1.5.3. Medidas oscilatórias (propriedades viscoelásticas).....	26
4.1.6. Medidas de difusão.....	26
 4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 27
4.2.1. Análises químicas das galactomananas.....	27
4.2.2. Análises Reológicas.....	32
4.2.2.1. Medidas relativas não-oscilatórias dos sistemas com ágar e misturas ágar:galactomanana guar.....	32
4.2.2.2. Medidas dinâmicas absolutas não-oscilatórias dos sistemas com ágar e misturas ágar:galactomanana.....	33
4.2.2.3. Medidas oscilatórias (propriedades viscoelásticas) dos sistemas com ágar e misturas ágar:galactomanana.....	36
4.2.3. Testes de difusão.....	40



4.3. CONCLUSÕES.....	42
5. MICROPROPAGAÇÃO.....	43
5.1. REVISÃO DA LITERATURA.....	43
5.1.1. Meios de cultivo.....	45
5.1.1.1. Componentes dos meios cultivo.....	46
5.1.2. Regeneração de plantas através de calos.....	48
5.1.3. Micropropagação de espécies lenhosas.....	50
5.2. USO DE GALACTOMANANA COMO SUBSTITUTA PARCIAL DO ÁGAR NA ORGANOGÊNESE INDIRETA DE TABACO ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) cv. AMARELINHO MAUS.....	52
5.2.1. INTRODUÇÃO.....	53
5.2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
5.2.2.1. Material vegetal.....	54
5.2.2.2. Desinfestação e germinação das sementes.....	54
5.2.2.3. Uso de diferentes concentrações de galactomanana de guar como substitutas parciais do ágar.....	54
5.2.2.4. Indução de calos e brotos de tabaco.....	55
5.2.2.5. Indução de raízes.....	55
5.2.2.6. Crescimento de plantas.....	56
5.2.2.7. Condições de cultura.....	56
5.2.2.8. Análise estatística.....	56
5.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.2.3.1. Uso de diferentes concentrações de galactomanana de guar como substitutas parciais do ágar.....	58
5.2.3.2. Indução de calos e brotos em explantes foliares de tabaco.....	59
5.2.3.3. Enraizamento.....	60
5.2.4. CONCLUSÕES.....	62
5.3. USO DE GALACTOMANANA COMO SUBSTITUTA PARCIAL DO ÁGAR NA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO ( <i>Malus prunifolia</i> Borkh) .....	63
5.3.1. INTRODUÇÃO.....	64
5.3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
5.3.2.1. Material vegetal.....	67
5.3.2.2. Fase de multiplicação.....	67
5.3.2.3. Fase de enraizamento.....	67
5.3.2.4. Condições de cultura.....	68
5.3.2.5. Análise estatística.....	68
5.3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70

5.3.3.1. Multiplicação.....	70
5.3.3.2. Enraizamento.....	72
5.3.4. CONCLUSÕES.....	77
5.4. USO DE GALACTOMANANA COMO SUBSTITUTA PARCIAL DO ÁGAR NA MICROPROPAGAÇÃO DE PEREIRA ( <i>Pyrus communis</i> L.) cv. DURONDEAU.....	78
5.4.1. INTRODUÇÃO.....	79
5.4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
5.4.2.1. Material vegetal.....	81
5.4.2.2. Fase de multiplicação.....	81
5.4.2.3. Fase de enraizamento.....	81
5.4.2.4. Condições de cultura.....	82
5.4.2.5. Análise estatística.....	82
5.4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
5.4.3.1. Multiplicação.....	84
5.4.3.2. Enraizamento.....	85
5.4.4. CONCLUSÕES .....	91
5.5. USO DE GALACTOMANANA COMO SUBSTITUTA PARCIAL DO ÁGAR NA MICROPROPAGAÇÃO DE MORANGUEIRO ( <i>Fragaria x ananassa</i> Duchesne) cv. PELICAN.....	92
5.5.1. INTRODUÇÃO.....	93
5.5.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	95
5.5.2.1. Material vegetal.....	95
5.5.2.2. Fase de multiplicação.....	95
5.5.2.3. Fase de enraizamento.....	95
5.5.2.4. Condições de cultura.....	96
5.5.2.5. Análise estatística.....	96
5.5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
5.5.3.1. Multiplicação.....	98
5.5.3.2. Enraizamento.....	100
5.5.4. CONCLUSÕES.....	103
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	104
7. ESTUDOS COMPLEMENTARES E PERSPECTIVAS.....	104
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
9. ANEXOS.....	127

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ANÁLISES QUÍMICAS DAS GALACTOMANANAS.....	27
TABELA 2 - PARÂMETROS REOLÓGICOS DE MEIO MS PREPARADO COM ÁGAR, GALACTOMANANA E MISTURA DE ÁGAR:GALACTOMANANA USANDO REÔMETRO BROOKFIELD LVDV-III, CONE-PLACA CP-52 E CONE COAXIAL SC4-18, À 25°C.....	34
TABELA 3 - EFEITO DO ÁGAR E MISTURAS DE ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR COMO AGENTES GELEIFICANTES NA ORGANOGÊNESE INDIRETA DE TABACO ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) CULTIVAR AMARELINHO MAUS EM MEIO MS CONTENDO 4,44 µM DE BA APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.....	58
TABELA 4 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NA ORGANOGÊNESE INDIRETA DE TABACO ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) CULTIVAR AMARELINHO MAUS APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.....	59
TABELA 5 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO ENRAIZAMENTO DE PLÂNTULAS DE TABACO ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) CULTIVAR AMARELINHO MAUS EM MEIO MS BASAL SEM FITORREGULADORES APÓS 10 DIAS DE CULTIVO.....	60
TABELA 6 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TABACO ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) CULTIVAR AMARELINHO MAUS EM MEIO MS BASAL SEM FITORREGULADORES APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.....	61
TABELA 7 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO NÚMERO MÉDIO DE BROTO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO ( <i>Malus prunifolia</i> Borkh) EM MEIO MS APÓS 40 DIAS DE CULTIVO PARA AS CONCENTRAÇÕES DE 2,22 E 4,44 µM DE BA.....	70
TABELA 8 - EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE O AGENTE GELEIFICANTE E A CONCENTRAÇÃO DE BA NA PORCENTAGEM DE BROTO HIPERHÍDRICO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO ( <i>Malus prunifolia</i> Borkh) EM MEIO MS APÓS 40 DIAS DE CULTIVO.....	71
TABELA 9 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO ENRAIZAMENTO DO PORTA-ENXERTO DE MAÇÃ MARUBAKAIDO ( <i>Malus prunifolia</i> Borkh) EM MEIO ½MS SUPLEMENTADO OU NÃO COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE AIB APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.....	73
TABELA 10 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NA MULTIPLICAÇÃO DE PEREIRA ( <i>Pyrus communis</i> L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO QL SUPLEMENTADO COM 4,44 µM BA E 0,29 µM GA <sub>3</sub> APÓS 40 DIAS DE CULTIVO.....	84
TABELA 11 - EFEITO DOS AGENTES GELEIFICANTES NO ENRAIZAMENTO DE BROTO DE PEREIRA ( <i>Pyrus communis</i> L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO ½QL SUPLEMENTADO OU NÃO COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE AIB APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.....	86

TABELA 12 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO ENRAIZAMENTO DE BROTOS DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO ½MS SUPLEMENTADO OU NÃO COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE AIB APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.....88

TABELA 13 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* Duchesne) CULTIVAR PELICAN EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM 4,44 µM DE BA APÓS 40 DIAS.....99

TABELA 14 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* Duchesne)) CULTIVAR PELICAN EM MEIO ½MS BASAL SUPLEMENTADO COM 0,022 µM DE BA APÓS 30 DIAS.....101

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA GENÉRICA DAS GALACTOMANANAS (GOLDSTEIN, ALTER e SEAMAN 1973).....	8
FIGURA 2 – (a) PLANTA DE <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> ( <a href="http://www.lamberty.com/technologies/guar.cfm">www.lamberty.com/technologies/guar.cfm</a> , 2004) (b) VAGENS IMATURAS; (c) VAGENS MADURAS E SEMENTES ( <a href="http://www.texturantsystems.com/texturant/html/e/productos/guar.htm">www.texturantsystems.com/texturant/html/e/productos/guar.htm</a> , 2004).....	10
FIGURA 3 – (a) ÁRVORE DE <i>Cassia fastuosa</i> ; (b) FLORES; (c) VAGENS MADURAS; (d) SEMENTES (LORENZI, 1998).....	12
FIGURA 4 – (a) ÁRVORE DE <i>Leucaena leucocephala</i> ; (b) VAGENS MADURAS; (c) SEMENTES (ZILLER, 2004).....	13
FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE GALACTOMANANA.....	21
FIGURA 6 - PERFIL DE HPSEC-MALLS PARA: (I) GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> , (II) GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>Cassia fastuosa</i> E (III) GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>Leucaena leucocephala</i> . (A) DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ E (B) DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	31
FIGURA 7 – VALORES DE VISCOSIDADE APARENTE DE GÉIS DE ÁGAR E MISTURAS DE AGAR:GALACTOMANANA DE GUAR EM MEIO MS, USANDO RÊOMETRO BROOKFIELD LVDV-III, SPINDLE HELIPATH (T-F), 0,2 S <sup>-1</sup> , À 25°C.....	32
FIGURA 8 – MÓDULO DE CISALHAMENTO ELÁSTICO (G') E MÓDULO DE CISALHAMENTO VISCOSO (G'') EM FUNÇÃO DA PORCENTAGEM DE DEFORMAÇÃO ( $\gamma$ ) DA REGIÃO DO COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA MEIO MS GELEIFICADO COM: ÁGAR (6 g.L <sup>-1</sup> ). (A <sub>1</sub> ) FREQUÊNCIA DE 0,1 HZ E (A <sub>2</sub> ) FREQUÊNCIA DE 10 HZ; ÁGAR (3 g.L <sup>-1</sup> ), (B <sub>1</sub> ) FREQUÊNCIA DE 0,1 HZ E (B <sub>2</sub> ) FREQUÊNCIA DE 10 HZ, À 25°C.....	36
FIGURA 9 – MÓDULO DE CISALHAMENTO ELÁSTICO (G') E MÓDULO DE CISALHAMENTO VISCOSO (G'') EM FUNÇÃO DA PORCENTAGEM DE DEFORMAÇÃO ( $\gamma$ ) DA REGIÃO DO COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA MEIO MS GELEIFICADO COM A MISTURA: ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L <sup>-1</sup> ), (A <sub>1</sub> ) FREQUÊNCIA DE 0,1 HZ E (A <sub>2</sub> ) FREQUÊNCIA DE 10 HZ; ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L <sup>-1</sup> ), (B <sub>1</sub> ) FREQUÊNCIA DE 0,1 HZ E (B <sub>2</sub> ) FREQUÊNCIA DE 10 HZ; ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L <sup>-1</sup> ), (C <sub>1</sub> ) FREQUÊNCIA DE 0,1 HZ E (C <sub>2</sub> ) FREQUÊNCIA DE 10 HZ; À 25°C.....	37
FIGURA 10 – MÓDULO DE CISALHAMENTO ELÁSTICO, G' (■) E MÓDULO DE CISALHAMENTO VISCOSO, G'' (●), VERSUS FREQUÊNCIA ( $f$ ) PARA MEIO MS BASAL GELEIFICADO: COM: ÁGAR (6 g.L <sup>-1</sup> ), ÁGAR (3 g.L <sup>-1</sup> ), MISTURAS ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L <sup>-1</sup> ), ÁGAR:GALACTOMANANA DE	

GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) USANDO REÔMETRO HAAKE, RS-75, COM SENSOR C60/2°, À 25°C, EQUIPADO COM SOFTWARE HAAKE.....38

FIGURA 11 - VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA,  $\eta''$  ( $\sigma$ ) VERSUS VELOCIDADE ANGULAR ( $\omega$ ) PARA MEIO MS BASAL GELEIFICADO: COM: ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR (3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) USANDO REÔMETRO HAAKE, RS-75, COM SENSOR C60/2°, À 25°C, EQUIPADO COM SOFTWARE HAAKE.....39

FIGURA 12 – RELAÇÃO TAN  $\delta$  (G''/G') PARA MEIO MS BASAL GELEIFICADO COM: ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR (3 g.L<sup>-1</sup>), MISTURA ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), À 0,1 Hz, 25°C.....40

FIGURA 13 – DIFUSÃO DE AZUL DE METILENO EM MEIO GELEIFICADO COM: ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>), AGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) OU ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), À 25°C.....41

FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANOGÊNESE INDIRETA DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) CULTIVAR AMARELINHO MAUS.....57

FIGURA 15 - FLUXOGRAMA BÁSICO DA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* Borkh).....69

FIGURA 16 – PROLIFERAÇÃO DE BROTO DE PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* Borkh) EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM 4,44  $\mu$ M DE BA E GELEIFICADO COM: (a) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>); (b) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>); (c) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) APÓS 40 DIAS DE CULTIVO (BARRA: 10mm).....71

FIGURA 17 - ENRAIZAMENTO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* Borkh) EM MEIO ½MS SEM AUXINA (a, b, c); SUPLEMENTADO COM 0,49  $\mu$ M DE AIB (d, e, f); SUPLEMENTADO COM 4,90  $\mu$ M DE AIB (g, h, i) GELEIFICADO COM: (I) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>); (II) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>); (III) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) APÓS 30 DIAS DE CULTIVO. SETAS: MOSTRAM A PRESENÇA DE CALOS (BARRA: 10mm).74

FIGURA 18 - FLUXOGRAMA BÁSICO DA MICROPROPAGAÇÃO DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU.....83

FIGURA 19 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NA MULTIPLICAÇÃO DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO QL SUPLEMENTADO COM 4,44  $\mu$ M BA E 0,29  $\mu$ M GA<sub>3</sub> GELEIFICADO COM: (a) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>); (b) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>); (c) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>). APÓS 40 DIAS DE CULTIVO (BARRA: 10mm) .....85

FIGURA 20 - EFEITO DOS AGENTES GELEIFICANTES NO ENRAIZAMENTO DE BROTO DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO ½QL SEM AUXINA (a, b, c); SUPLEMENTADO COM 0,98 µM DE AIB (d, e, f); SUPLEMENTADO COM 9,80 µM DE AIB (g, h, i) E GELEIFICADO COM: (I) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>); (II) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>); (III) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) APÓS 30 DIAS DE CULTIVO. SETAS MOSTRAM A PRESENÇA DE CALOS (BARRA: 10mm).....87

FIGURA 21 - EFEITO DOS AGENTES GELEIFICANTES NO ENRAIZAMENTO DE BROTO DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO ½MS SEM AUXINA (a, b, c); SUPLEMENTADO COM 0,49 µM DE AIB (d, e, f); SUPLEMENTADO COM 2,46 µM DE AIB (g, h, i) E GELEIFICADO COM: (I) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>); (II) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>); (III) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), APÓS 30 DIAS DE CULTIVO. SETAS MOSTRAM A PRESENÇA DE CALOS (BARRA: 10mm).....89

FIGURA 22 - FLUXOGRAMA BÁSICO DA MICROPROPAGAÇÃO DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* DUCHESNE) CULTIVAR PELICAN.....97

FIGURA 23 - BROTO DE MORANGUEIRO (*Fragaria ananassa* DUCHESNE) CULTIVAR PELICAN EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM 4,44 µM DE BA E GELEIFICADO COM: (a) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>), (b) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>), (c) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), (d) ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) APÓS 40 DIAS DE CULTIVO.....99

FIGURA 24 – BROTO DE MORANGUEIRO (*Fragaria ananassa* CULTIVAR PELICAN) APÓS 30 DIAS DE ENRAIZAMENTO EM MEIO ½MS BASAL SUPLEMENTADO COM 0,022 µM BA E GELEIFICADO COM (a) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>), (b) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>), (c) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), (d) ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) (BARRA: 10mm).....101

FIGURA 25 - DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE MORANGUEIRO ENRAIZADAS *IN VITRO* EM MEIO MODIFICADO (MISTURA DE ÁGAR:GALACTOMANANA) OITO MESES DEPOIS DE TRANSPLANTADAS PARA O SOLO.....102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA - ácido abscísico

AIA - ácido indol-3-acético

AIB - ácido indol-3-butírico

ANA - ácido  $\alpha$ -naftaleno acético

BA - benziladenina

C-2 – carbono 2

C-4 - carbono 4

cv. - cultivar

d.i. – diâmetro interno

dn/dc – relação entre índice de refração e concentração de uma amostra

2,4-D – ácido 2,4 diclorofenoxiacético

$f$  - frequência

G' - módulo de cisalhamento elástico

G'' - módulo de cisalhamento viscoso

G\* - módulo de cisalhamento complexo

GA<sub>3</sub> - ácido giberélico

Gal - galactose

CG - cromatografia gasosa

GM - galactomanana

h - horas

HPSEC – high-performance size exclusion chromatography

K - índice de consistência

M - concentração em mol.L<sup>-1</sup>

Man - manose

m/m – massa por massa



$\overline{M}_n$  - Massa molar numérica média

MS - MURASHIGE e SKOOG, 1962

$\frac{1}{2}$ MS - MS meia força (com metade da concentração de sais do meio de cultura MS)

MS<sub>0</sub> - Meio MS sem fitorreguladores

MS<sub>1</sub>-sais minerais e compostos orgânicos MS, sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>), suplementado com 4,44  $\mu$ M de BA.

MS<sub>2</sub>-sais minerais MS, tiamina (0,1 mg.L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg.L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) e suplementado com 4,44  $\mu$ M de BA e 0,54  $\mu$ M de ANA (Stolarz et al., 1991).

$\overline{M}_w$  - Massa molar ponderal média

n - índice de fluxo

$\eta$  - viscosidade

$\eta^*$  – viscosidade dinâmica complexa

NaBH<sub>4</sub> - boroidreto de sódio

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - nitrato de amônia

NaOCl - hipoclorito de sódio comercial

QL - QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977

$\frac{1}{2}$ QL - meio de cultura QL com metade da concentração de macronutrientes

tan ( $\delta$ ) – relação G''/G'

$\tau$  - força de cisalhamento

$\tau_0$  - ponto de ruptura

<sup>13</sup>C-R.M.N. - ressonância magnética nuclear de carbono treze

WPM - Wood Plant Medium

$\omega$  - velocidade angular

$\gamma$  - taxa de cisalhamento

$\gamma$  - deformação

## RESUMO

Sistemas formulados a partir de polissacarídeos podem originar géis de grande interesse por beneficiar e melhorar processos biotecnológicos. Os meios nutritivos semi-sólidos são, geralmente, geleificados com ágar, cujas principais marcas são importadas e apresentam alto custo. Galactomananas obtidas a partir de 3 espécies de leguminosas (*Leucaena leucocephala*, *Cyamopsis tetragonolobus* e *Cassia fastuosa*) com relação Manose:Galactose de 1,7:1; 1,9:1 e 3,0:1, respectivamente, foram utilizadas como substitutas parciais do ágar em meios de cultivo de micropropagação. Por meio de análises reológicas e teste de difusão caracterizou-se as propriedades físico-químicas do meio controle (ágar, 6 g.L<sup>-1</sup>) e das misturas com 50% de substituição (m/m) de ágar por galactomanana de guar, cássia ou leucena. O meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) geleificado com as misturas ágar:galactomanana de guar ou cássia foi testado na organogênese indireta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. Amarelinho Maus, onde a indução de brotos a partir de explantes de folhas, o comprimento das raízes e o crescimento das plantas foram maiores que no meio controle, onde foi observado a presença de brotos com fenótipo anormal. As misturas de ágar:galactomanana de guar ou cássia foram usadas na micropropagação do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh), onde foi observada uma redução na porcentagem de brotos hiperhídricos, e na mistura de ágar:galactomanana de cássia suplementado com 4,44 µM de BA, não ocorreu a presença de brotos hiperhídricos. A porcentagem máxima de enraizamento (100%) foi obtida no meio ½MS suplementado com 0,49 µM de AIB e geleificado com as misturas de ágar:galactomanana de guar ou cássia. O número médio de raízes por broto e o tamanho médio das raízes, de uma maneira geral, foi maior nos meios modificados. Os meios Quoirin e Lepoivre (1977) e Murashige e Skoog (1962) foram utilizados na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Durondeau, onde observou-se que para o número e tamanho de brotos houve um aumento de 46 e 22%, respectivamente, em relação ao meio controle, quando foi utilizada a mistura de ágar:galactomanana de guar. O meio Quoirin e Lepoivre (1977) com macronutrientes reduzidos à metade e geleificado com a mistura de ágar:galactomanana de cássia apresentou a maior porcentagem de brotos enraizados (91,2%), número de raízes por broto (4,27) e comprimento de raízes (2,09 cm), além de menores calos na base dos explantes. Os géis de ágar:galactomanana de guar, cássia ou leucena foram testados em meios de cultivo de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cv. Pelican, onde a mistura de ágar:galactomanana de guar mostrou número mais elevado de brotos para todos os subcultivos, com um aumento de cerca de 120%, no primeiro subcultivo, em relação ao meio controle, que mostrou brotos cloróticos e senescentes. O comprimento das raízes para todos os subcultivos foi maior com as misturas de ágar:galactomanana de guar ou cássia. Somada às vantagens acima, a substituição parcial do ágar por galactomananas em sistemas geleificantes pode significar uma redução dos custos. O preço do ágar varia consideravelmente, dependendo do tipo e marca. No Brasil, por exemplo, varia entre US\$ 100-200/kg, enquanto a goma guar pode ser encontrada por US\$ 3/kg. Já que 50% de ágar é substituído no meio de cultivo, pode ocorrer uma redução de custo de 17-34 vezes no preparo do meio, mostrando o potencial uso das galactomananas em aplicações comerciais de cultura de tecidos.

---

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de *Prunus* sp. *Acta Horticulturæ*, New York, v. 78, p. 437-442, 1977.

## ABSTRACT

Systems formulated with polysaccharides can originate gels of great interest for to benefit and to improve many biotechnological processes. The semi-solids nutritive media are, usually, gellified with agar, whose principal marks are imported difficulting the access. In this study, galactomannans obtained from 3 leguminous species (*Leucaena leucocephala*, *Cyamopsis tetragonolobus* and *Cassia fastuosa*) with Mannose: Galactose ratio of 1.7:1; 1.9:1 and 3.0:1, respectively, were used as partial agar substitutes in culture medium. Through rheological analyses and diffusion test was characterised and compared the physical-chemical properties of the control (agar, 6 g.L<sup>-1</sup>) and the mixtures with 50% substitution (w/w) of agar by guar, cassia or leucena galactomannan. Murashige and Skoog (1962) medium gellified with the mixtures of agar:guar or cassia galactomannan were tested in the indirect tobacco organogenesis (*Nicotiana tabacum*) cv. Amarelinho Maus, where the induction of shoots starting from explants of leaves, the length of the roots and the growth of the plants were higher than in the control medium, where was observed the presence of shoots with abnormal phenotype. The mixtures of agar:guar or cassia galactomannan were used in the multiplication and rooting of the apple tree rootstock Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh) where was observed reduction in the percentage of hyperhydric shoots; in the medium gellified with the mixture of agar:cassia galactomannan supplemented with 4.44 µM of BA, the presence of hyperhydric shoots was not observed. The maximum percentage of rooting (100%) it was obtained in the ½MS medium supplemented with 0.49 µM of AIB and gellified with mixtures agar:guar or cassia galactomannan. The number of roots for shoots and the size of the roots, in general, were higher in the modified media. The media Quoirin and Lepoivre (1977) and Murashige and Skoog (1962) were used in the pear tree micropropagation (*Pyrus communis* L.) cv. Durondeau, where it was observed that for the number of shoots and size of shoots had an increase of 46 and 22%, respectively, when mixture agar:guar galactomannan was used. Quoirin and Lepoivre (1977) medium with macronutrients reduced to ½ of the original concentration gellified with mixture agar:cassia galactomannan presented the higher percentage of rooted shoots (91.2%), number of roots for shoots (4.27), length of roots (2.09 cm) and smaller calluses in the explants. Gels of mixtures agar:guar or cassia or leucena galactomannan were tested in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cv. Pelican plant cultivation medium. The mixture agar:guar galactomannan showed higher number of shoots for all subcultures, with an increase about 120% in the first subculture, in relation to the controls medium that showed shoots chlorotics and senescent. The length of the roots for all the subcultures was larger in the means of mixtures agar:guar or cassia galactomannan. Added to the advantages of the partial substitution of the agar observed in the results above, it also contributes to a cost reduction. Since that agar prices vary considerably depending on brand and type, for example, in Brazil, guar GM has a cost around US\$ 3/kg, while for agar it varies between US\$ 100-200/kg. Then, 50% of agar substitution in the medium, it allows a cost 17 to 34 times lower, showing the potential use of the galactomannans for commercial application in plant tissue culture, justified by both biotechnological aspects and price.

---

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de *Prunus* sp. **Acta Horticulturae**, New York, v. 78, p. 437-442, 1977.

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna tem o papel principal de suprir as necessidades alimentícias mínimas de bilhões de pessoas, além de outras aplicações como vestuário e habitação, vem-se tornando economicamente insustentável, devido aos elevados custos de insumos e serviços, associados aos fatores de produção. Nessas circunstâncias, cabe ao melhoramento de plantas a importante tarefa de aumentar a produtividade e qualidade dos produtos, a mais baixo custo, sem agressão ao meio ambiente (BARROS, 1999). Como solução viável, a produção de mudas com qualidade superior e em larga escala pode ser feita através de técnicas biotecnológicas. Nesse caso, a cultura de células e tecidos vegetais vem constituindo uma estratégia de interesse, em função de suas potencialidades e de bons resultados apresentados para um grande número de espécies vegetais. Tal abordagem tem permitido a clonagem e multiplicação em larga escala de espécies vegetais e de germoplasmas selecionados, os quais, quando realizados por processos convencionais (estaquia, enxertia, sementes, alporquia, entre outros), apresentam baixo rendimento (MANTELL; MATTHEWS e McKEE, 1994).

A cultura de tecidos que, pode ser definida como a cultura de todos os tipos de células, tecidos e órgãos de plantas dentro de condições assépticas (SMITH e DREW, 1990), é baseada na teoria da totipotência formulada por Schleiden e Schwann no final dos anos trinta. Esses autores afirmavam que a célula é autônoma, tendo potencial necessário para originar um organismo completo. O termo é geralmente utilizado para descrever todos os tipos de cultura de partes de plantas *in vitro* incluindo a micropropagação (TORRES; CALDAS e FERREIRA, 1998).

Um dos trabalhos pioneiros nesta área foi realizado por White (1934), que mostrou ser possível isolar pequenos grupos de células de *Lycopersicon esculentum* e manter o crescimento de ápices radiculares por um tempo indeterminado. A partir destes experimentos iniciais, tornou-se possível cultivar qualquer tipo de tecido de planta *in vitro*. O calo, por exemplo, (massa de células indiferenciadas que está em contínua proliferação celular), é derivado de um único grupo inicial de células e pode ser subcultivado, multiplicado, e, em muitos casos, induzido para reiniciar diferenciação de raízes e brotos, formando plantas completas (FULLER e GALLON, 1995).

Em certos tipos de cultivo, meios sólidos com a utilização de agentes geleificantes são freqüentemente preferíveis a culturas líquidas. Esses agentes ligam-se reversivelmente à água e, dependendo da concentração utilizada, garantem a umidade desejável no meio (ENDREB, 1994). Entretanto, torna-se cada vez mais evidente que a concentração e o tipo de matriz usados podem influenciar profundamente na resposta dos tecidos de plantas cultivados *in vitro*, e vários estudos mostram que a escolha do agente geleificante é uma consideração importante para o sucesso da micropropagação (DEBERGH, 1983; SINGHA, 1984; NAIRN; FURNEAUX e STEVENSON, 1995; EBRAHIM e IBRAHIM, 2000).

A substância mais comumente utilizada para este propósito é o ágar, que possui convenientes propriedades geleificantes e estabilidade durante o uso, já que é extraordinariamente resistente à hidrólise enzimática das amilases que possam estar presentes, característica de fundamental importância para sua utilização em culturas de células (ENDREB, 1994). Embora seja o agente geleificante mais amplamente usado nos meios de cultura de tecidos de plantas, seu custo é relativamente alto e, em muitos estudos, diferentes respostas das plantas a tipos ou marcas de ágar têm sido relatadas.

Um problema comum relacionado com o uso do ágar, é a necrose dos tecidos e a hiperhidricidade, desordem fisiológica, caracterizada por folhas translúcidas e quebradiças, que causa dificuldade no enraizamento e adaptação às condições *ex vitro* (DEBERGH; HARBAOUI e LEMEUR, 1981).

Várias explicações foram propostas para os efeitos variáveis do ágar: difusão limitada de água e componentes do meio (ROMBERGER e TABOR, 1971; STOLZ 1971), presença de impurezas (KOHLENBACH e WERNICKE, 1978; NAIRN, FURNEAUX e STEVENSON, 1995), diferenças na força de gel e composição mineral (SINGHA, 1982, DEBERGH, 1983).

Muitos trabalhos existem sobre a substituição do ágar por outros agentes geleificantes como o Gelrite®, nome comercial da goma gelana, a qual é produzida por fermentação da bactéria *Pseudomona elodea*. O polissacarídeo é constituído de unidades de glucose, ácido glucurônico e ramnose com razão molar de 2:1:1. Em pesquisas realizadas por O'Neill, Selvendran e Morris (1983) foi sugerido que a estrutura primária da gelana consiste de unidades repetidas do tetrassacarídeo:  $\Pi(3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\Pi4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA}\text{-}(1\Pi4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\Pi4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\Pi)$ .

A gelana apresentou melhores resultados para o cultivo *in vitro* de vários tecidos vegetais (KODA et al., 1988; SCHERER, 1988; CHNG e GOH, 1994; PODWYSZYNSKA e OLSZEWSKI, 1995). Willians e Taji (1987), encontraram maior porcentagem de

sobrevivência no Gelrite® do que no ágar em culturas de várias espécies de plantas lenhosas. Segundo Ishii et al. (1998), a gelana foi mais adequada que o ágar, como agente geleificante na indução de calos de orquídeas e Saadat e Hennerty (2002) mostraram que a multiplicação de brotos de noz foi significativamente melhor no meio geleificado com gelana. Porém, em muitos casos, o uso de goma gelana tende a promover a hiperhidricidade (PASQUALETTO; ZIMMERMAN e FORDHAM, 1986, 1988) e, como o ágar, tem alto custo.

Na busca de novos agentes geleificantes que diminuam os custos e tragam benefícios para a micropropagação de certas espécies vegetais, polissacarídeos como o amido, têm sido testados. Amidos obtidos a partir de diferentes fontes (milho, cevada, batata, arroz e trigo) foram utilizados em meios de cultura para a micropropagação de diversas variedades de cevada (SORVARI, 1986a, c; SORVARI e SCHIEDER, 1987; KUHLMAN e FOROUGH-WEHR, 1989), batata (SORVARI, 1986b), tabaco e cenoura (HENDERSON e KINNERSLEY, 1988). Certos autores mencionaram que o sucesso no uso do amido pode ser devido em parte, às características nutricionais que este polissacarídeo apresenta (CALLEBERG e JOHANSSON, 1993). Entretanto, existe um inconveniente, já que certas plantas liberam amilase *in vitro*, que degrada o amido, tornando o meio progressivamente mais líquido ao longo da incubação, além de ser mais opaco, o que dificulta a detecção de contaminantes e a observação de raízes e ainda apresenta sinerese. Muitas vezes, provoca a hiperhidricidade (ZIMMERMANN; BHARDWAJ e FORDHAM, 1995).

Outros agentes geleificantes como o sago, material amiláceo, obtido a partir de caule de *Metroxylon sagu* R. e isubgol, uma mucilagem coloidal, produzida a partir de casca de *Plantago ovata* F. foram utilizados com resultados satisfatórios por Bhattacharya; Dey e Bhattacharyya (1994) na propagação de *Dentranthema grandiflora* T. (crisântemo). Naik e Sarkar, em 2001, também utilizaram sago com sucesso para a micropropagação de dez genótipos diferentes de *Solanum tuberosum* L. (batata).

Tecido parênquimático de maçã foi utilizado por Titel et al. (1987), como agente de solidificação de meio para o cultivo de brotos de *Betula pendula* R., *Gerbera jamesonii* H. *Floribunda rose* T. e para tecidos de calos de *Daucus carota* L. e *Chenopodium album* L., com bons resultados para algumas culturas.

Misturas de dois agentes geleificantes também têm sido utilizadas em muitas pesquisas. Zimmermann; Bhardwaj e Fordham (1995) utilizaram misturas de amido e Gelrite® na multiplicação de macieira, pereira e framboesa produzindo igual ou melhor proliferação de gemas do que com ágar, em algumas cultivares testadas. Ágar e amido de

mandioca foram utilizados por Ferri et al. (1998), que obtiveram resultados positivos no enraizamento de maçã.

Mais recentemente, Jain e Babbar (2002) usaram com sucesso goma katira, exsudada de *Cochlospermum religiosum*, como substituinte parcial do ágar na multiplicação e enraizamento de *Syzygium cuminii* e embriogênese somática de *Albizia lebbbeck*. O biopolímero contém porcentagem superior a 50% de uma mistura de xilose e galactana, além de outros componentes como ácido acético, ácido gônico e ácido  $\alpha$ -ciclopérmico, Lima-Nishimura et al. (2003) obtiveram aumento na taxa de multiplicação e enraizamento do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh) e da cultivar Jonagored (*Malus domestica* Borkh) quando a mistura de ágar e xiloglucana extraída a partir de sementes de *Hymenaea courbaril* na proporção de 4:2 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, foi utilizada como agente geleificante no meio de cultivo.

As propriedades texturais dos géis utilizados nos cultivos de tecidos vegetais têm sido o objetivo de muitas pesquisas, já que de acordo com estas propriedades, um determinado agente geleificante facilitará ou não a difusão dos nutrientes, fitorreguladores e água para os explantes, e resultará no sucesso ou não da micropropagação (DEBERGH, 1983; OWENS e WOZNIAK, 1991; SCHOLTEN e PIERIK, 1998a).

No presente trabalho, galactomananas obtidas de diferentes fontes vegetais foram analisadas com relação a razão molar man:gal, massa molar, açúcar total e teor de proteína. As características reológicas das soluções desses biopolímeros e de sua interação com ágar em meios de cultura foram avaliadas através de espectros mecânicos (oscilatórios e não oscilatórios). Os géis foram testados como suporte para a organogênese indireta de tabaco e micropropagação de morangueiro, macieira e pereira, a partir de protocolos previamente estabelecidos para cada uma das espécies.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

- ❖ Caracterizar por métodos químicos e físico-químicos galactomananas obtidas a partir de diferentes fontes vegetais utilizando Cromatografia gasosa, HPSEC-MALLS e dosagens espectrofotométricas.
- ❖ Caracterizar as propriedades reológicas de meios controles (ágar ou galactomananas) e das misturas de ágar:galactomanana.
- ❖ Testar a possibilidade de utilização dos géis mistos como suporte para a micropropagação vegetal de algumas espécies selecionadas.

### 2.2. Objetivos específicos

- ❖ Analisar galactomananas em relação a razão manose:galactose, a massa molar, ao teor de açúcar total e de proteínas.
- ❖ Analisar o comportamento reológico através de medidas não oscilatórias e oscilatórias dos polissacarídeos isolados e das misturas em meio de cultivo, assim como avaliar a difusão dos mesmos.
- ❖ Testar a mistura ágar:galactomanana obtida de diferentes fontes (*Cyamopsis tetragonolobus* e *Cassia fastuosa*) durante as etapas de organogênese indireta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cultivar Amarelinho Maus.
- ❖ Testar a mistura ágar:galactomanana obtida de diferentes fontes (*Cyamopsis tetragonolobus* e *Cassia fastuosa*) na multiplicação e enraizamento do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia* Bork) e da pereira (*Pyrus comunnis* L.) cultivar Durondeau.
- ❖ Testar a mistura ágar:galactomanana obtida de diferentes fontes (*Cyamopsis tetragonolobus*, *Cassia fastuosa* e *Leucaena leucocephala*) na multiplicação e enraizamento de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cultivar Pelican.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Ágar e galactomanana

Polissacarídeos são polímeros compostos de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas formadas pela eliminação da água entre o grupo hidroxila hemiacetal de uma unidade e um grupo hidroxila primário ou secundário de uma unidade adjacente. Pode consistir de um pequeno ou grande número de unidades e, em estrutura, podem ser lineares, ramificados ou ocasionalmente polímeros cíclicos. Podem ser homopolissacarídeos, compostos de um único tipo de monômero ou podem ser heteropolissacarídeos, compostos por dois ou mais diferentes tipos de monômeros (PAZUR, 1994).

Os polissacarídeos solúveis em água são extensamente aplicados na indústria. Sua utilidade está baseada em um largo espectro de características funcionais cujas principais características são a habilidade de modificar as propriedades de soluções aquosas ou dispersões, capacidade de espessar, suspender, formar géis, estabilizar, emulsionar, quelar e formar filmes e membranas (FARKAS e GLICKSMAN, 1967; SANDERSON, 1981; DZIEZAK, 1991).

Muitas outras aplicações são baseadas nas suas interações com materiais biológicos e sintéticos. Características como sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, caráter hidrofílico, atoxidez, entre outras, têm sido exploradas para o preparo e uso de um número crescente de derivados (YALPANI e SANDFORD, 1987).

Segundo Stanley (1995), o ágar é um polissacarídeo membro das galactanas que ocorre como componente da matriz intercelular em numerosas algas marinhas vermelhas da classe das Rhodophytas. Consiste de cadeias lineares de  $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-galactose}$  e  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-galactose}$  alternadas. Muitas dessas unidades são substituídas com grupos sulfato, metil e ácido pirúvico (GLICKSMAN, 1982). Duas principais frações foram obtidas por Araki (1937), em ágar extraído de *Gelidium amansii*: a agarose – um polissacarídeo neutro, e a agarpectina - um polímero sulfatado. Posteriores estudos realizados por Duckworth e Yaphe em 1971a e b, indicaram porém que o ágar não é constituído destas duas frações apenas, mas compreende uma família de polissacarídeos que diferem entre si em sutis detalhes na estrutura.

Esse hidrocolóide é extraído de várias espécies de algas vermelhas, das quais as mais importantes são do gênero *Gelidium* e *Gracilaria* (WHISTLER e SMART, 1953;

GLICKSMAN, 1982), que existem em abundância na região costeira do Japão, México, Portugal e Dinamarca (DZIEZAK, 1991).

Devido a diferenças em espécies, habitat, época do ano, condições de extração e processamento, ágaes com diferentes massas moleculares e vários conteúdos de 3,6-anidrogactose (3,6-AG), que possuem géis com diferentes características têm sido obtidos (GLICKSMAN, 1983; SCHOLTEN e PIERIK, 1998a; MARINHO-SORIANO, 2001; MARINHO-SORIANO e BOURRET, 2003). E, tem sido usados em muitos produtos alimentícios onde são úteis pelas suas propriedades emulsificantes, estabilizantes, e formadores de gel resistentes ao aquecimento (GLICKSMAN, 1982; LAWRENCE, 1976). É muito importante e amplamente conhecido como agente geleificante em meios para a cultura de microorganismos (WHISTLER e SMART, 1953; BIER, 1994).

As galactomananas constituem o segundo maior grupo de polissacarídeos de armazenamento com respeito à sua distribuição no mundo vegetal (SHCHERBUKHIN, 1993), onde ocorrem como reserva polissacarídica de um grupo de plantas mucilaginosas ou plantas “gumosas”. São comumente encontradas no endosperma de sementes da família *Leguminosae* (REID, 1985). Em menor quantidade são encontradas em outras espécies da família *Palmae*, *Annonaceae*, *Convolvulaceae* e *Loganiaceae* (DEA e MORRISON, 1975; DEY, 1978), onde são utilizadas como reserva alimentícia durante a germinação e proteção contra a dessecação (EDWARDS et al., 1989).

São uma família de polissacarídeos que apresentam como estrutura genérica (Figura 1) uma cadeia principal com unidades de  $\beta$ -D-manopirranose com ligações (1 $\rightarrow$ 4), substituídas no carbono 6 por unidades de  $\alpha$ -D-galactopirranose (DEA e MORRISON, 1975; DEY, 1978; SONI e BOSE, 1985). As galactomananas possuem alta capacidade de se ligar à água e formar soluções viscosas em altas diluições. Comparadas com o amido em base igual de massa, as soluções de galactomanana são cinco vezes mais viscosas (WHISTLER e SMART, 1953).

As razões molares entre manose:galactose podem ser diferentes, dependendo da fonte e do método de extração utilizado (DEA e MORRISON, 1975; LEITNER, 1991; REICHER et al., 1991; ZAWADZKI-BAGGIO et al., 1992; GANTER et al., 1993; PETKOWICZ, 1993; LUCYSZYN, 1994; TAVARES, 1994;; VARGAS-RECHIA et al., 1995; PETKOWICZ et al., 1998; GANTER e REICHER, 1999; PETKOWICZ et al., 2001).

A solubilidade em água depende do conteúdo de galactose substituinte na cadeia principal. As  $\beta$ -mananas lineares puras, na ausência de ramificações de unidades de galactose, são completamente insolúveis em água (McCLEARY et al., 1981).

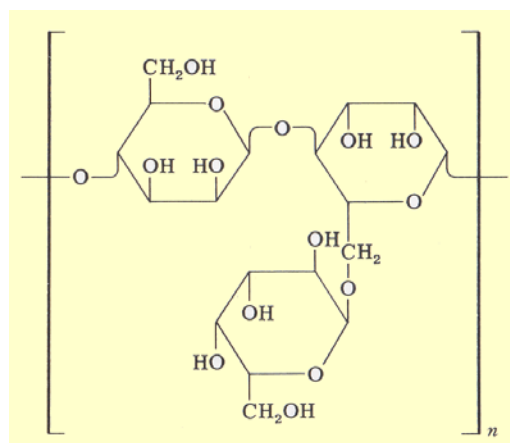


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA GENÉRICA DAS GALACTOMANANAS (GOLDSTEIN; ALTER e SEAMAN, 1973)

O grau de substituição da cadeia principal de manose por unidades de galactose varia de 25 à 97%, com um alto grau de substituição ocorrendo em legumes mais filogenicamente avançados (EDWARDS et al., 1989). A base para a sua vasta aplicação em uma grande variedade de produtos é a alta capacidade de ligar-se à água inibindo a sinerese, o seu grande poder espessante e a estabilidade de suas soluções.

Duas galactomananas são produzidas comercialmente em grandes quantidades: a goma guar a partir de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* e a alfarroba a partir de sementes de *Ceratonia siliqua*. Outras gomas como a tara e a fenugreek obtidas de sementes de *Caesalpinia spinosa* e *Trigonella Foenum-graecum*, respectivamente, também são usadas em menores quantidades (GLICKSMAN, 1986; HERALD, 1986 a,b; MAIER et al., 1993).

A importância deste polissacarídeo pode ser vista no seu amplo uso, principalmente em indústrias alimentícias (GLICKSMAN, 1979; NEUKON, 1989; DZIEZAK, 1991, WARD e ANDON, 1993; LUCYSZYN et al., 2000), farmacêuticas (WHISTLER e SMART, 1953), cosméticas (CHUDZIKOWSKI, 1971), papel (GENERAL MILLS INC., 1972), tintas (TENNECO CHEMICAL INC., 1973), como agente geleificante na obtenção de cápsulas de sementes artificiais (SORVARI et al., 1997), anticoagulante (PIRES et al., 2001), entre outros.

Em razão da utilização de três espécies de leguminosas nesse trabalho, a saber: guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), cássia (*Cassia fastuosa*), e leucena (*Leucaena leucocephala*), uma breve descrição botânica será feita a seguir.

### 3.1.1. Goma guar - *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.

**Sinônimos:** *Psoralea tetragonoloba* L., *Cordaea fabaeformis* Spr., *Cyamopsis psoralioides* DC., *Dolichos psoraleoides* Lam., *D. fabaeformis* L'Hér., *Lupinus trifoliatum* Cav.

**Nomes comuns:** Guar, cluster-bean, Siam-bean, Calcutta-lucerne, *Cyamopsis*, C. à quatre ailes, C. fausse-psoralé.

**Descrição botânica:** Pertence à família *Leguminosae*, sub-família *Papilionoideae*, gênero *Cyamopsis*, tribo *Faboideae*. Planta autoalógama de autogamia preponderante, anual ou perene, de porte ereto com até 3 metros de altura (Figura 2a). Folhas alternadas, 3-folioladas e pecioladas. Folíolos ovóides, de 5-6 x 3-3,5 cm com borda dentada. Estipulas lineares. Flores sésseis em ramos axilares paucifloros. Cálice piloso. Alas rosado-púrpuras. Legumes ligeiramente comprimidos entre as sementes com 3,5-6 cm de comprimento. Com 6-12 sementes por vagem de cor branca, cinza ou negra (MONGE, 1994) (Figura 2c).

É originária da Índia e Paquistão, com maior desenvolvimento no verão e grande resistência à seca. Suas vagens verdes são utilizadas como alimento (Figura 2b). Apresenta grande potencial como matéria-prima para a indústria pelo alto teor de galactomanana contida nas sementes (19-43%) (WHISTLER e HYMOWITZ, 1979). Quando plantada sob condições normais em áreas secas, a produtividade média é da ordem de 1000 à 1200 kg de sementes por hectare de plantas cultivadas. Porém, quando plantada sob o sistema de irrigação, seu rendimento atinge facilmente mais de 3000 kg de sementes por hectare (SANTA ROSA, 1977). O plantio é recomendado para setembro-outubro, e a colheita ocorre entre 6 a 7 meses (CASTRO; CARRER e AMARAL, 1988).

No Brasil, a cultura de guar merece atenção através dos ensaios conduzidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC – São Paulo), além da instalação de áreas de cultivo no Nordeste (SANTA ROSA, 1977). Em São Paulo, os resultados têm sido pouco promissores, em função dos prejuízos causados por pragas, além das condições ambientais que favorecem o florescimento precoce (CASTRO; CARRER e AMARAL, 1988).

Segundo Douglas e Routley (2005) cerca de 160 mil toneladas de guar foram consumidas mundialmente no ano de 2001.



FIGURA 2 – (a) PLANTA DE *Cyamopsis tetragonoloba* ([www.lamberty.com/technologies/guar.cfm](http://www.lamberty.com/technologies/guar.cfm), 2004) (b) VAGENS IMATURAS; (c) VAGENS MADURAS E SEMENTES ([www.texturantsystems.com/texturant/html/e/productos/guar.htm](http://www.texturantsystems.com/texturant/html/e/productos/guar.htm), 2004).

A goma guar apresenta capacidade de inchamento e solubilidade em água fria, o que não é possível com a galactomanana de alfarroba, sendo importante para produtos que não são aquecidos. Por outro lado, a goma guar mostra menor tendência de interação com outros polissacarídeos. Estas duas características são devidas ao maior grau de substituição dessa galactomanana (McCLEARY et al., 1985; DEA, 1987; NEUKON, 1989).

Por ser um polissacarídeo neutro, a goma guar apresenta uma tolerância ou compatibilidade para dissolver íons metálicos como o cálcio. Em produtos alimentícios, essa característica é benéfica para fórmulas variadas envolvendo ingredientes comuns, como o leite, agentes de fermentação e outros (HERALD, 1986a).

A viscosidade de soluções de goma guar pode ser aumentada, quando benzoato de sódio é acrescentado ao sistema. Máxima hidratação do biopolímero poderá ser obtida devido à elevação do pH de 6,5 para 7,8 em presença de 25% (m/m) desse sal em solução de  $1\text{g.L}^{-1}$  de goma guar. Por outro lado, sais de sulfato, quando acrescentados ao sistema, competem pela

água, inibindo a hidratação da goma, diminuindo a viscosidade. Redução do pH da solução abaixo de 3,5 também causa um decréscimo de viscosidade. Ingredientes como o açúcar, em altas porcentagens (67-71%), também causa uma significativa diminuição na viscosidade de goma guar, isto porque, também apresenta alta afinidade por água, o que reduz a ação de hidratação da goma (CARLSON; ZIEGENFUSS e OVERTON, 1962; HERALD, 1986a).

### 3.1.2. Cássia - *Cassia fastuosa* Willd. Benth.

**Nomes populares:** marimari, maripixuma, parica, cassia, medalhão de ouro.

**Descrição botânica:** Pertence à família *Leguminosae*, sub-família *Caesalpinoideae*, gênero *Cassia*. Pequena árvore perenefólia, com até 10 m de altura com fuste tortuoso de até 40 cm de diâmetro. Casca acinzentada fissurada. Folhas compostas pinadas com 8 a 13 folíolos, discolores de até 5 cm de comprimento por 2 cm de largura (Figura 3a). Inflorescências compactas nas extremidades dos ramos. Flores pentâmeras, hermafroditas de pétalas amarelas (Figura 3b). Frutos chatos, curvos, castanhos, do tipo vagem, de até 25 cm de comprimento por até 3 cm de largura (Figura 3c) (BACKES e IRGANG, 2002).

Ocorre na floresta de pinhais do Paraná e Santa Catarina. A árvore em flor é um belo espetáculo da natureza, cobrindo toda a copa de círculos amarelos. É excelente para o paisagismo em geral, tanto pela beleza da floração como pela forma da copa. Tem sido muito utilizada para arborização de ruas na região sul do país. Como planta rústica e adaptada à insolação direta não pode faltar nos reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente. A madeira é moderadamente pesada, compacta, dura e durável, sendo empregada para obras leves, caixaria, confecção de brinquedos, laminados, etc. Floresce nos meses de novembro-janeiro. A maturação dos frutos ocorre durante os meses de junho e julho. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis (Figura 3d) das quais se extrai a galactomanana. Um quilograma de sementes contém aproximadamente 5.700 unidades (LORENZI, 1998).

Trabalhos com *Cassia fastuosa* foram realizados no laboratório de Biopolímeros inicialmente por Tavares (1994), que isolou e caracterizou a galactomanana extraída de sementes desta espécie. Posteriormente, Germano em 1996 sintetizou derivados sulfatados a partir desta galactomanana com atividades anticoagulantes. Amaral (1998) fez estudos de interação com xantana e da interferência de soluções iônicas sobre a viscosidade. Mercê et al. (1998) a utilizaram em estudos de complexação com íons metálicos. Petkowicz et al. (1998) fizeram análise da região de C-4 da galactomanana por <sup>13</sup>C-R.M.N. Sierakowski et al. (2000)

sintetizaram um derivado carboxílico que foi utilizado em estudos de interação com albumina (SIERAKOWSKI et al., 2002). Recentemente, Ono (2004) sintetizou derivados sulfatados que foram aplicados em ensaios de atividade antiviral contra o HSV-1 (vírus Herpes simples), em experimentos *in vitro*.



FIGURA 3 – (a) ÁRVORE DE *Cassia fastuosa*; (b) FLORES; (c) VAGENS MADURAS; (d) SEMENTES (LORENZI, 1998)

### 3.1.3. Leucena - *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

**Sinônimos:** *Mimosa leucocephala* Lam., *Acacia biceps* Willd., *A. frondosa* Willd., *A. glauca* (L.) Willd., *A. leucocephala* Link., *Leucaena glabrata* Rose, *L. glauca* (Willd.) Benth., *L. latisiliqua* Gillis, *L. salvadorensis* Standl., *Mimosa glauca* L.

**Nomes comuns:** Acacia, leucaena, ipil-ipil, acacia bela rosa, aroma blanco, acácia esponjeira, leucena, tamarindo silvestre, uaxim, entre outros.

**Descrição botânica:** Pertence à família *Leguminosae*, sub-família *Mimosoideae*, gênero *Leucaena*, tribo *Euminoseae*. Árvore e/ou arbusto de folhas bipinadas de 15-25 cm de comprimento, ráquis pubescentes, com quatro a oito pares de pinas de 5-10 cm de



comprimento contendo, cada uma, 10 a 15 pares de folíolos oblongo lineares, agudos e inequiláteros, de 7-15 mm de comprimento por 3-4 mm de largura. Possui estípulas triangulares e glabras de 15 mm de comprimento (Figura 4a). A inflorescência é globosa, de 2,5-3,0 cm de diâmetro, solitária, formada de 100 a 180 flores brancas e minúsculas. As vagens, geralmente de 15 a 60, são finas com 12-18 cm de comprimento e cobertas com minúsculos pêlos, quando jovens (Figura 4b). Cada vagem contém de 15 a 25 sementes, de cor marrom brilhante (Figura 4c) das quais é extraída a galactomanana (MÍTZI, 2002).

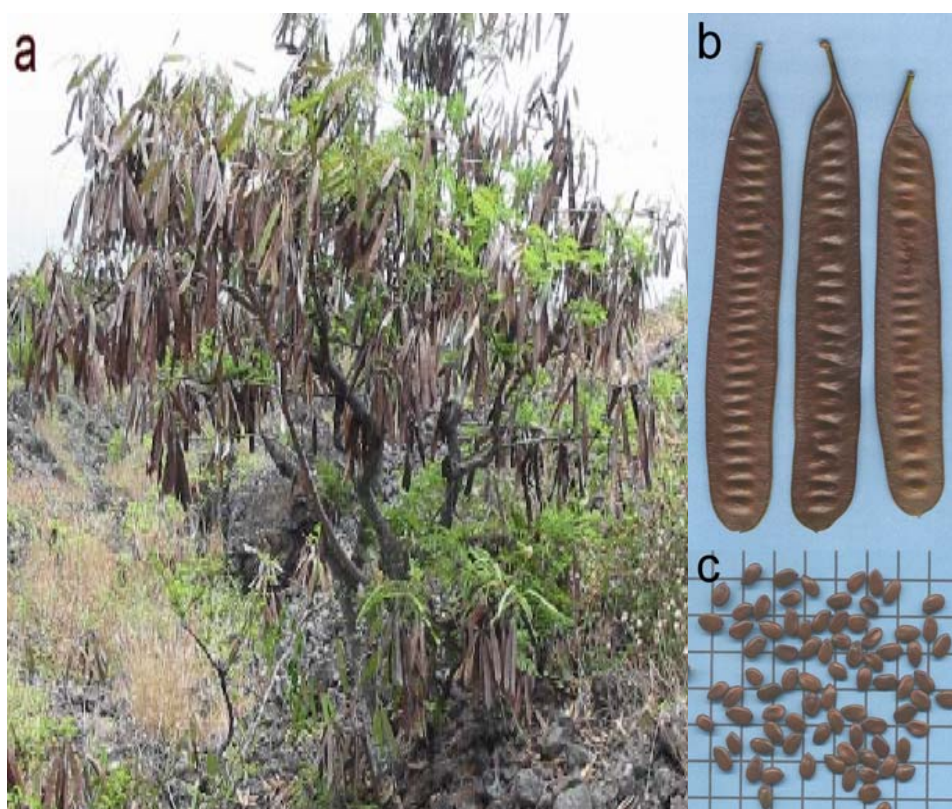


FIGURA 4 – (a) ÁRVORE DE *Leucaena leucocephala*; (b) VAGENS MADURAS; (c) SEMENTES (ZILLER, 2004).

A Leucena é uma leguminosa perene, arbórea, originária da América Central e atualmente disseminada por toda região tropical. Apresenta sistema radicial profundo e o movimento das folhas xerofíticas contribuem grandemente para sua resistência à seca. Tem desenvolvimento inicial lento, mas é de recuperação rápida após qualquer poda pesada. Sendo altamente tolerante a seca, resistente a pestes e doenças e tendo a habilidade de crescer em uma grande variedade de tipos de solos tem sido uma importante árvore agroflorestal. Sua



madeira e galhos podem ser usados para a fabricação de papel, e as folhas, caules, flores e brotos são boa fonte de proteína e minerais para animais de criação (SHELTON e BREWBAKER, 1994; SOEDARJO e BORTHAKUR, 1996).

No Brasil, a leucena é uma das forrageiras mais promissoras para a região semi-árida, principalmente pela capacidade de rebrota durante a época de seca, pela adaptação as condições edafoclimáticas do Nordeste e pela excelente aceitação por caprinos, ovinos e bovinos (SOUSA, 2004). Na Região norte do Paraná, testes para o seu cultivo têm sido realizados com sucesso por pesquisadores do IAPAR (SÁ, 1997).

Representa uma alternativa para a alimentação animal, principalmente no que se refere a composição bromatológica e na sua grande habilidade de manter o valor nutritivo pouco afetado durante a época mais seca do ano. A produção de matéria seca comestível é constituída de folhas e caules finos, que apresentam teores de proteína bruta em torno de 25% quando jovens (FARIAS; SILVA e QUEIROZ FILHO, 2004). A proteína é de alto valor nutritivo, semelhante ao da alfafa e seus aminoácidos encontram-se em proporções balanceadas. Ademais, a leucena é uma excelente fonte de minerais.

Seu uso em banco de proteína para pastagem direta ou para produção de forragem verde, para produção de feno e de silagem, para o enriquecimento da pastagem nativa e da silagem de gramíneas, e para a produção de sementes (13.700 sementes/ kg - IPEF, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais – Sementes, 2004) mostra-se como uma alternativa viável para a agropecuária.

Devido as suas características forrageiras, o seu uso na alimentação animal é talvez o aspecto mais importante na atualidade. Em um bom sistema de manejo, a leucena deve contribuir com aproximadamente 30% da alimentação (COSTA et al. 2004). Todavia, uma das limitações como planta forrageira é a presença da mimosina, um aminoácido que, se ingerido em excesso pelos animais, faz com que reduza a produção de tiroxina, um hormônio tireoidal, ocasionando a queda de pêlos e, em casos extremos, a completa debilidade do bócio (BREWBAKER e HYLIN, 1965; SOEDARJO e BORTHAKUR, 1996).

Interações da galactomanana com íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  foram estudadas por Mercê et al. (1998, 2000). Sierakowski et al. (2000) fizeram modificações em posição específica para a obtenção de polieletrólitos e derivados anfifílicos. Sierakowski et al. (2002) estudaram galactomananas oxidadas desta mesma espécie em interação com albumina bovina. Recentemente, Ono et al. (2003) e Ono (2004) obtiveram derivados sulfatados e urônico/sulfatados, os quais foram avaliados quanto ao potencial antiviral.

Da literatura sabe-se que uma das mais importantes e úteis propriedades das galactomananas é sua interação com outros polissacarídeos, que resulta em um significativo aumento de viscosidade ou formação de gel (DEA e MORRISON, 1975; MORRIS e MILES, 1986; FERNANDES; GONÇALVES e DOUBLIER, 1992; VIEBKE e PICULELL, 1992; ZHAN et al., 1993; TURQUOIS et al., 1994; SUDHAKAR; SINGHAL e KULKARNI, 1996). A obtenção de géis binários, portanto, será relatada no próximo tópico.

#### **3.1.4. Propriedades reológicas e interações com galactomananas**

Para investigar as propriedades de interação de polissacarídeos, métodos reológicos têm sido de grande valia. Em linhas gerais, reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento da matéria (LAPASIN e PRICL, 1995; BARNES; HUTTON e WALTERS, 1989). O termo foi introduzido por Eugene Cook Bingham a partir de suas publicações na década de vinte (BARNES; HUTTON e WALTERS, 1989). A preocupação com o aspecto de fluência da matéria remonta um passado distante e os anais da história da reologia registram como conceito primordial a observação de ser um material mais espesso do que outro, e assim mais resistente à fluência do que outro.

O comportamento reológico dos polímeros pode ser fortemente influenciado pela massa molecular, ramificações da cadeia polimérica, polaridade, copolimerização, mistura de polímeros (blendas), partículas sólidas suspensas, interações polímero-solvente e rigidez da cadeia (BARNES; HUTTON e WALTERS, 1989; SHAW, 1975). As moléculas ou partículas isoladas podem ligar-se por ligações cruzadas covalentes (valências primárias) e/ou associar-se por forças de atração de Van der Waals, e/ou associar-se simplesmente por emaranhamento mecânico (SHAW, 1975).

Os meios de cultivo semi-sólidos são uma mistura complexa de vários componentes, assim como acontece em géis alimentícios, onde as propriedades texturais são em princípio determinadas pelas propriedades estruturais combinadas do gel matriz e dos demais ingredientes (TOLSTOGUZOV e BRAUDO, 1983). Segundo Ring e Stainsby (1982), estes ingredientes ou partículas acrescentadas podem ser classificados em ativos ou inativos, de acordo com seus efeitos nas propriedades reológicas. Uma partícula inativa tem pequena afinidade química pela matriz polimérica e não aumenta a força do gel. Em contraste, uma partícula ativa normalmente tem uma forte interação com o gel matriz, o que acarreta em um aumento na força desse gel.

Géis são redes entumecidas possuindo propriedades coesivas de sólidos e propriedades de transporte difusivo dos líquidos. Elasticamente tendem a ser mais macios e, osmoticamente são altamente reativos (SILBERBERG, 1989). Um gel polimérico é geralmente uma solução na qual as cadeias são reticuladas de uma forma mais permanente que um mero emaranhado mecânico (BARNES; HUTTON e WALTERS, 1989).

Os géis poliméricos são ditos viscoelásticos quando exibem uma combinação de elasticidade e escoamento viscoso. Quando esses materiais viscoelásticos sofrem um estiramento, parte da energia envolvida é armazenada como energia elástica, sendo que várias partes do sistema são deformados até novas posições, não em equilíbrio umas em relação às outras. A parte restante da energia é dissipada sob a forma de calor, e várias partes do sistema fluem para novas posições de equilíbrio, umas em relação às outras (SHAW, 1975).

As propriedades viscoelásticas de sistemas de polissacarídeos podem ser facilmente caracterizadas por medidas de cisalhamento oscilatórias dentro de pequenas condições de deformação. Sendo,  $G'$  (módulo de cisalhamento elástico), a medida de energia elástica armazenada durante um ciclo de oscilação e,  $G''$  (módulo de cisalhamento viscoso), a medida de energia dissipada como escoamento viscoso, a aparência dos espectros mecânicos, a variação de  $G'$  e  $G''$  em função da frequência oferece uma boa maneira de descrever as propriedades globais e é útil para entender os mecanismos físico-químicos dos géis de biopolímeros (DOUBLIER; CASTELAIN e LEFEBVRE, 1993; CHEN e DICKINSON, 1998).

Quando um fluido viscoso apresenta uma relação linear entre taxa de deformação e tensão de cisalhamento, ou seja, a viscosidade é constante, ele é chamado newtoniano. Por outro lado, a relação entre taxa de deformação e tensão de cisalhamento pode não ser constante para outros fluidos, dependendo ainda do tempo de observação ou de forças de recuperação elástica. Nestes casos, os fluidos são chamados não newtonianos (BILLMEYER, 1984). Entre esses, estão fluidos pseudoplásticos como as galactomananas, que apresentam uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, em uma determinada concentração. Para esses biopolímeros, o comportamento reológico independe do tempo de aplicação da tensão de cisalhamento (DEALY e BROADHEAD, 1993). Contudo, podem exigir uma tensão de cisalhamento mínima ou ponto de ruptura ( $\tau_o$ ) para que seja iniciado o escoamento ou a movimentação do fluido (WALTER, 1998). Um efeito oposto ao pseudoplástico é o comportamento dilatante, no qual a viscosidade aumenta com o aumento da

razão de cisalhamento; este comportamento não é observado em polímeros (BILLMEYER, 1984).

É conhecido que propriedades de soluções de certos sistemas de biopolímeros podem ser modificadas pela adição de um segundo polímero na solução (DEA; BLANSHARD e MITCHEL, 1979; DEA e MORRISON, 1975; MORRIS, 1990). Um grande aumento na viscosidade ou até a formação de gel, em concentrações abaixo da qual isto ocorreria para um ou outro polímero em sistemas puros, poderá ser obtida.

Interações sinérgicas entre polissacarídeos são comercialmente atraentes e assunto de difundida exploração tecnológica (CAIRNS; MILES e BROWNSEY, 1987). Polímeros de custo elevado podem ser substituídos por uma mistura geleificante mais barata, e vários tipos de géis podem ser formados, dependendo da natureza dos componentes, da velocidade e extensão das misturas (MORRIS e MILES, 1986). Um tipo de mistura onde são bem conhecidos os efeitos sinérgicos é aquele envolvendo certas galactomananas e galactanas componentes da família do ágar e carragenana (VIEBKE e PICULELL, 1992, TURQUOIS; TARAVEL e ROCHAS, 1993; TURQUOIS et al., 1994). Baker; Carrow e Woodmansee (1949) e Deuel e Neukon (1954) foram os primeiros a observar que misturas de galactomanana com carragenana ou ágar aumentam a força e a elasticidade desses frágeis géis. O mais baixo custo das galactomananas, comparado com o ágar, e as suas interações sinérgicas aumentam a possibilidade de novas funcionalidades com grande importância industrial (DEA e MORRISON, 1975; HERALD, 1986a, b; BAIARD, 1993; ZHAN et al., 1993).

A extensão de sinergismo observado nas misturas de galactana/galactomanana é variável. Geralmente, condições que aumentam a tendência de galactana para se auto-agregar (mais baixo conteúdo de sulfato, presença de certos sais), também aumenta suas propriedades de interação (MORRIS, 1990). Para as galactomananas, os efeitos sinérgicos dependem do grau e padrão de substituição da cadeia lateral (DEA e CLARK, 1986; DEA, 1987).

O primeiro mecanismo de gelatinização sinérgica elucidado para misturas galactomanana/galactana foi uma ligação da manose da cadeia principal da galactomanana com a dupla hélice da galactana (REES, 1972; DEA; McKINNON e REES, 1972). Esse modelo foi baseado em experimentos de agarose e kappa-carragenana misturadas com diversas galactomananas. Foi mostrado que, pela adição de galactomanana, a geleificação pode ser induzida abaixo da concentração normal de geleificação para as galactanas. Além disso, foi observado que galactanas com baixa massa molar, as quais normalmente não

formariam um gel, geleificam ou precipitam quando galactomananas são acrescentadas ao sistema. A sinérgica interação foi maior para as galactomananas menos substituídas, o que foi adotado como uma evidência de que a manose da cadeia principal estava envolvida na gelatinização.

A ligação intermolecular entre a manose da cadeia principal e a dupla hélice da galactana foi posteriormente avaliada por Cairns; Miles e Brownsey (1987). Eles estudaram o modelo de difração de raio-X para a kappa-carragenana e furcellarana, sozinhas e em misturas com galactomananas.

Segundo Tako e Nakamura (1988), a interação sinérgica entre as moléculas de agarose e galactomanana de alfarroba pode ocorrer entre o átomo de oxigênio do anel da  $\alpha$ -L-anidro galactose da agarose, e a hidroxila de C-2 da manose cadeia principal da molécula de galactomanana.

#### 4. ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO

## 4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1.1. Fontes de Polissacarídeos

- ❖ A galactomanana (GM) de sementes de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) comercializada pela Indian Gum Industries Limited –B-5/7. M.I.A., Basni, Phase–Ist, Jodhpur–342005, Índia foi fornecida pela empresa Herbarium S.A. – Produtos Naturais – Curitiba, Paraná, Brasil.
- ❖ As sementes de *Cassia fastuosa* (cássia) e *Leucaena leucocephala* (leucena) foram coletadas na cidade de Curitiba, Estado de Paraná, Brasil, onde um “voucher” (excicata) das espécies encontra-se no Herbarium UPGB (Departamento de Botânica/UFPR) sob números 5904 e 14028, respectivamente.
- ❖ O ágar (Merck KgaA, 6427, Darnstadt, Germany – referência 1615, lote k26477915945, ágar puríssimo) foi obtido do comércio.

### 4.1.2. Extração de Galactomanana

As sementes de *C. fastuosa* e *L. leucocephala* (50g) foram fervidas em água por 20 minutos para inativação enzimática, e submetidas a uma extração aquosa exaustiva à temperatura de 25°C, em liquidificador. O processo foi repetido várias vezes, as alíquotas foram reunidas e o resíduo foi separado através de centrifugação 7000 rpm/40min. O sobrenadante foi concentrado em rota-evaporador sob pressão reduzida à 40°C. NaCl foi acrescentado à solução para se obter uma concentração de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> da solução e o polissacarídeo foi precipitado com 2 volumes de etanol comercial. A GM foi filtrada em pano e seca à temperatura ambiente (Figura 5).

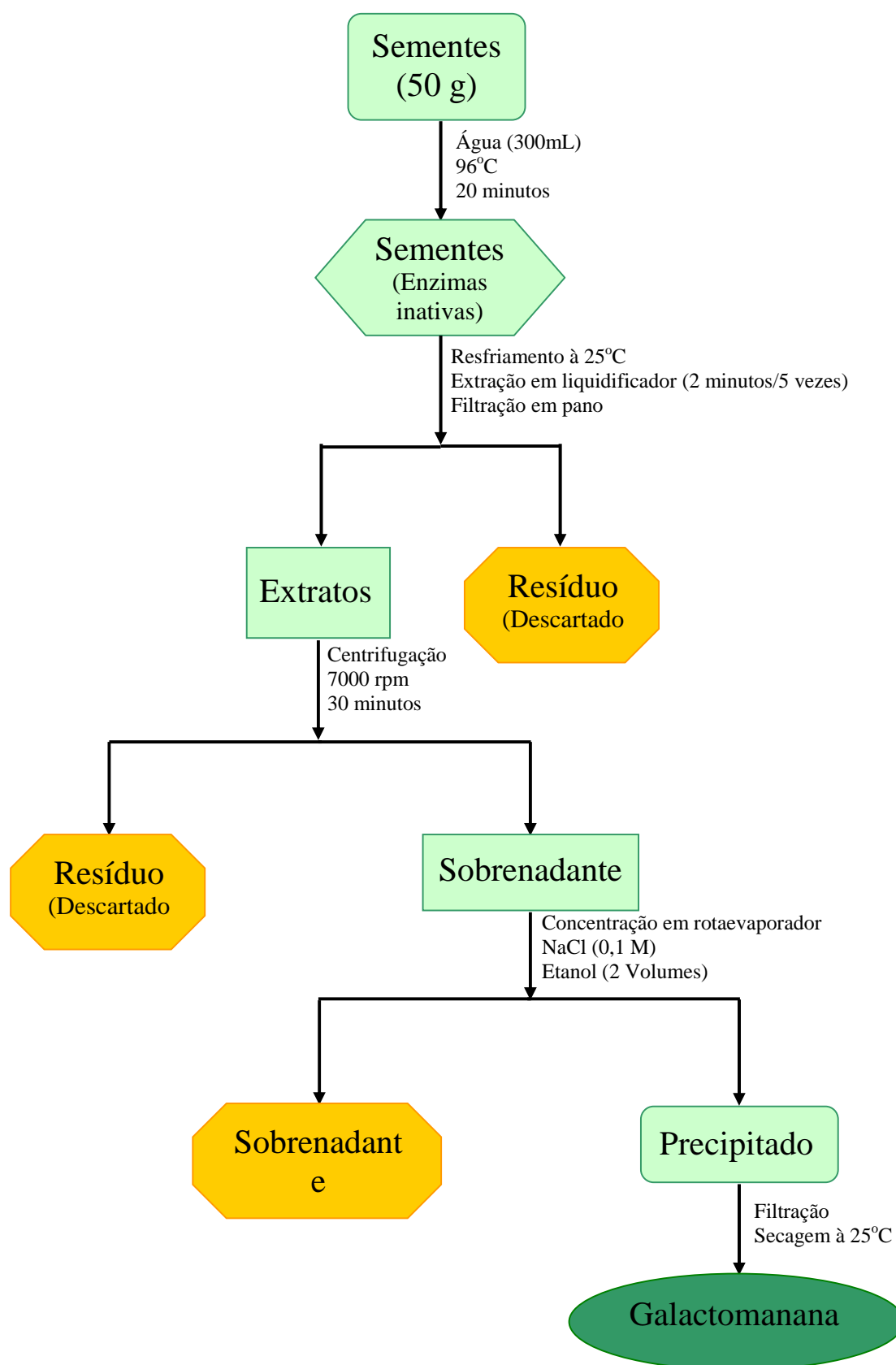


FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE GALACTOMANANA



### 4.1.3. Análises químicas das amostras de galactomananas

#### 4.1.3.1. Determinação de açúcar total

O carboidrato total foi estimado pelo método fenol-sulfúrico em espectrofotômetro COLEMAN 395-UV à 490 nm, utilizando-se como padrão, mistura manose:galactose (1:1) (1 mg.mL<sup>-1</sup>) para a obtenção de uma curva de calibração de 10 a 100 µg.mL<sup>-1</sup> (DUBOIS et al., 1956). As dosagens foram repetidas quatro vezes, com três repetições cada vez.

#### 4.1.3.2. Determinação do teor de proteína

O conteúdo de proteína foi determinado de acordo com os seguintes métodos:

##### a. Método de Hartree

As dosagens de proteína das galactomananas foram realizadas em espectrofotômetro COLEMAN 395-UV à 650 nm. Um padrão de albumina bovina (1 mg.mL<sup>-1</sup>) foi utilizado para a obtenção de uma curva de calibração de 50 a 200 µg.mL<sup>-1</sup> (HARTREE, 1972). As dosagens foram repetidas quatro vezes, com três repetições cada vez.

##### b. Pelo processo de digestão de Kjeldahl.

Análise de proteína, baseada na determinação de nitrogênio, feita pelo processo de digestão Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) onde a matéria orgânica é decomposta, e o nitrogênio existente é transformado em amônia. Sendo a equação:

$$\% \text{ de proteínas} = (B-A) \times N \times f \times 0,0014 \times 100 \times F/P$$

onde:

B, mL da solução de NaOH 0,1 N, gasto na titulação do branco

A, mL da solução de NaOH 0,1 N. gasto na titulação da amostra

N, Normalidade da solução de NaOH (0,1 N)

f, fator de correção da solução de NaOH

F, fator empirico (6,25), para transformar o número de gramas de N encontrado, em número de gramas de protídios

P, peso da amostra, em gramas

#### 4.1.3.3. Determinação da composição monossacarídica

##### a. Hidrólise com ácido trifluoracético

Hidrólise ácida total de amostras de 10 mg de galactomanana foram realizadas com ácido trifluoracético 1M, durante 5 horas, em banho de água à 96°C. O ácido residual foi evaporado e as amostras lavadas várias vezes com água (ADAMS, 1965).

##### b. Redução, acetilação e análise cromatográfica

Os monossacarídeos obtidos após hidrólise ácida, foram reduzidos com boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), de aldeídos à álcool, por 12 horas, à temperatura de 50°C. Os íons  $\text{Na}^+$  foram removidos com resina Lewatit S-100 catiônica ( $\text{H}^+$ ), e o ácido bórico foi eliminado por codestilação com metanol (3 x 5 mL), seguida de evaporação em rotaevaporador, na forma de éster volátil, borato de trimetila. Os alditóis foram então submetidos à acetilação com anidrido acético em presença de piridina como catalisador (1:1 v/v), à temperatura ambiente, por 18 horas. Após este período, o processo foi interrompido pela adição de gelo moído, quando ocorreu formação de ácido acético, a partir do anidrido acético presente em excesso. Os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio (5 mL), e a piridina foi eliminada através de tratamentos sucessivos com  $\text{CuSO}_4$  a 5%, quando houve a formação de sal de piridina (WOLFROM e THOMPSON, 1963a, b).

Os monossacarídeos liberados convertidos em acetato de alditóis foram analisados por cromatografia gasosa (CG) em cromatógrafo gasoso Hewlett Pachard, modelo 5890 A, série II, à temperatura de injeção de 220°C, com coluna J & W Scientific, modelo DB-225 (0,25 mm d.i. x 30 m), tendo nitrogênio como gás de arraste (2 mL.min<sup>-1</sup>).

#### 4.1.3.4. Análises de HPSEC-MALLS

O índice de refração das GMs foi determinado em um refratômetro diferencial WATERS, modelo 2410, em um comprimento de onda de 546 nm, utilizando-se concentrações de 1,0; 0,83; 0,66; 0,50; 0,33 e 0,17 mg.mL<sup>-1</sup>, que foram solubilizadas em uma solução aquosa de nitrito de sódio 0,1mol.L<sup>-1</sup> contendo 200 ppm de azida ( $\text{NaN}_3$ ) e filtradas em membrana Millipore de 0,45µm. A análise do índice de refração em função da concentração forneceu o valor de uma constante (dn/dc), utilizada para o cálculo da massa molar.

Os perfis da homogeneidade e da massa molar ponderal média ( $\overline{M}_w$ ) foram determinados por Cromatografia de Exclusão Estérica (HPSEC), contendo colunas de ultrahidrogel (2000,

500, 250 e 120), acopladas ao refratômetro descrito acima e com um detector de espalhamento de laser multiângulo, à 632,8 nm, modelo DAWN DSP-F, Wyatt Technology. As amostras foram solubilizadas em uma solução aquosa de nitrito de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> contendo 200 ppm de azida (NaN<sub>3</sub>) e filtradas em membrana Millipore de 0,45 e 0,22 µm. Utilizou-se como eluente a mesma solução, com fluxo controlado de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Os resultados da massa molar foram obtidos através de análise por computador, utilizando-se o software ASTRA 4.70.07 (WYATT, 1993).

#### **4.1.4. Preparo das misturas para as análises reológicas e testes de cultivo *in vitro***

As GMs foram dissolvidas em água destilada, sob agitação, pernoite à 25°C. A solução de GM foi acrescentada ao meio de cultura líquido basal MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). O pH de todos os meios foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1N.

O meio de cultura contendo GM foi aquecido em forno de microondas à 96°C e então misturado em diferentes proporções com solução aquosa de ágar previamente fundido, para se obter uma concentração final de mistura de 6 g.L<sup>-1</sup>.

O meio controle continha ágar 6 g.L<sup>-1</sup>. As amostras foram autoclavadas à 121°C por 20 min, resfriadas e armazenadas à 25°C.

Para os testes de cultivo *in vitro*, após a etapa de mistura dos agentes geleificantes e ajuste do volume das soluções, os meios foram colocados em frascos de cultivo cobertos com papel alumínio, autoclavados e armazenados. Nos ensaios de organogênese indireta de tabaco, antes do uso, os meios foram novamente fundidos em forno de microondas e colocados em placas de Petri.

#### **4.1.5. Reologia**

##### **4.1.5.1. Medidas relativas não-oscilatórias**

No sistema não-oscilatório as medidas de viscosidade aparente do ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) e misturas de ágar:GM de guar em diferentes proporções foram realizadas em Reômetro Brookfield, modelo LVDV-III, com spindle Helipath (T-F), taxa de cisalhamento de 0,2 rpm, à 25°C.

#### 4.1.5.2. Medidas dinâmicas absolutas não-oscilatórias

Medidas de viscosidade plástica do ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) e soluções de GM a 3 e 6 g.L<sup>-1</sup> foram realizadas em Reômetro Brookfield, modelo LVDV-III, cone-placa, spindle CP-52 ou cone coaxial SC4-18, após estabilização à 25°C, com a ajuda de um banho de circulação BROOKFIELD TC-500. Foram utilizadas taxas de cisalhamento entre 0,2 e 2,0 s<sup>-1</sup> para o ágar e misturas ágar:GM e, taxas de cisalhamento entre 5,0 e 600 s<sup>-1</sup>, para as soluções de GMs (soluções de baixa viscosidade).

Os resultados de análise de viscosidade plástica e yield stress (ponto de ruptura) foram calculados a partir da equação de Bingham (BARNES; HUTTON e WALTERS, 1989):

$$(\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma})$$

Os índices de consistência e de fluxo foram calculados pela equação de Power Law (KRUMEL e SARKAR, 1975):

$$(\tau = K\dot{\gamma}^n) \text{ ou } \eta = \tau/\dot{\gamma} = K\dot{\gamma}^{n-1}$$

onde:

$\eta$ , viscosidade (mPa.s)

$\tau$ , força de cisalhamento “shear stress” (Pa)

$\tau_0$ , ponto de ruptura “yield stress”

K, índice de consistência “consistency index”

$\dot{\gamma}$ , taxa de cisalhamento “shear rate” (s<sup>-1</sup>)

n, índice de fluxo (número que é a medida do desvio das propriedades de escoamento de um fluido do comportamento Newtoniano)

Os dados foram analisados através do programa Rheocalc.

#### **4.1.5.3. Medidas oscilatórias (propriedades viscoelásticas)**

Testes sobre as propriedades viscoelásticas dos meios com ágar (3 e 6 g.L<sup>-1</sup>) e das misturas de ágar:GM (3:3 g.L<sup>-1</sup>, m/m), foram realizados usando um Reômetro HAAKE, modelo RS75, com sensor de C60/2° Ti, temperatura controlada à 25°C por um sistema HAAKE Peltier TC-80. A faixa de frequência analisada foi de 0,05-10 Hz, deformação de 0,30-0,60%. Condições onde as amostras apresentaram comportamento viscoelasticidade linear, ou seja, quando a tensão ou deformação aplicadas não alteraram a estrutura física do sistema.

#### **4.1.6. Medidas de difusão**

Medidas de difusão foram realizadas no meio geleificado com ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) e misturas de ágar:GM (3:3 g.L<sup>-1</sup>, m/m).

Solução de azul de metileno (0,5 g.L<sup>-1</sup> de água) foi aplicada (50 µL) no topo de uma coluna de meio de cultura (5 mL) preparado em um tubo cônico graduado de 12 mL. A penetração do corante foi avaliada à 25°C, por observação visual na escala após 24, 48, 72 e 120 h.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro tratamentos. Cada tratamento foi constituído por 3 unidades experimentais. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

## 4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.2.1. Análises químicas das galactomananas

Com relação ao método de extração utilizado, a inativação enzimática inicial é necessária para que as enzimas presentes nas sementes não alterem a composição e a estrutura do polissacarídeo presente no endosperma.

A extração aquosa à 25°C e a purificação somente por centrifugação são processos simples e economicamente viáveis, já que o objetivo principal de nosso trabalho foi a substituição do ágar por um agente geleificante que diminuísse os custos da cultura de tecidos.

Os resultados obtidos para as análises químicas das GMs que foram utilizadas nos experimentos reológicos e de cultura de tecidos vegetais encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1 – ANÁLISES QUÍMICAS DAS GALACTOMANANAS

Fonte de Galactomanana	Rendimento* (%)	Relação Man:Gal	Proteínas <sup>1</sup> (%)	Proteínas <sup>2</sup> (%)	Carboidratos Totais (%)	$\overline{M}_w$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$\overline{M}_n$ (g.mol <sup>-1</sup> )
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> (Goma guar)	19-43**	1.9:1	10	4,20	85	675.100	538.700
<i>Cassia fastuosa</i> (Cássia)	37	3.0:1	11	6,70	82	462.600	365.000
<i>Leucaena leucocephala</i> (Leucena)	31	1.7:1	33	31,0	55	713.600	614.600

\* Obtido a partir de sementes totais

\*\*WHISTLER e HYMOWITZ (1979)

<sup>1</sup>Método de Hartree (HARTREE, 1972)

<sup>2</sup>Pelo processo de digestão de Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985)

Observa-se que os rendimentos em polissacarídeo, em relação às sementes totais para a *C. fastuosa* (37%) e *L. leucocephala* (31%), são considerados altos quando comparados com os resultados obtidos para a *C. fastuosa* (27%) e *L. leucocephala* (17,5%), por Tavares (1994) e Ono (2004), respectivamente. Enquanto outros dados da literatura indicam para outras espécies: *Mimosa scabrella* (30%) (GANTER, 1988), *Stryphnodendron barbatiman* (16,4%) (LEITNER, 1991), *Senna multijuga* (23%) (VARGAS-RECHIA et al., 1995), *Mimosa pseudincana* (27%), *Apuleia leiocarpa* (23%) e *Mimosa regnellii* (23%) (LUCYSZYN, 1994).

Com relação ao grau de substituição das GMs das espécies estudadas, observou-se grau intermediário para as de *L. leucocephala* (1,7:1) e *Cyamopsis tetragonolobus* (1,9:1). Resultados semelhantes foram mostrados por McCleary (1979) e Whistler e Smart (1953) para essas duas espécies, respectivamente. A GM de *C. fastuosa* apresentou relação manose:galactose de 3,0:1, que indica uma GM pouco substituída. Resultado semelhante para a mesma espécie foi obtido por Ono (2004) e para outras espécies como: *Bauhinia holophylla* (2,9:1) e *Delonix regia* (3,1:1) (LUCYSZYN, 1994), *Schizolobium amazonicum* (3,0:1) (PETKOWICZ, 1993; PETKOWICZ et al., 1998), pertencentes à mesma sub-família *Caesalpinoideae*. Já Tavares (1994) obteve para a mesma espécie em condições similares de extração uma relação man:gal de 5:1 e Amaral (1998) uma relação molar de 3,5:1.

A ocorrência de uma “família” de GMs em uma mesma espécie, já foi descrita para *Gleditsia triacanthos* (MANZI; MAZZINI e CEREZO, 1984) e *Schizolobium amazonicum* (PETKOWICZ, 1993), onde foram isolados quatro a cinco grupos de GMs com diferentes relações man:gal e que foram obtidas por extrações aquosas a diferentes temperaturas.

A diferença observada na relação man:gal entre as espécies pode ser explicada pela atividade enzimática da  $\alpha$ -galactosidase presentes *in vivo*. Edwards et al. (1992), observaram a atividade dessa enzima em endospermas de três espécies leguminosas representativas de grupos taxonômicos, *Trigonella foenum graecum* (fenugreek), *Cyamopsis tetragonolobus* (guar) e *Senna occidentalis* (sena), as quais tem GM com alto, médio e baixo teor de galactose, respectivamente. Endospermas foram analisados em diferentes estágios de desenvolvimento da semente, e os resultados mostraram que em "fenugreek" e guar, os níveis das enzimas foram constantes, porém com baixa atividade, enquanto que na sena houve um aumento na atividade da  $\alpha$ -galactosidase no período correspondente a deposição da GM. As relações man:gal nesses períodos foram determinadas, e constatou-se que para as duas primeiras espécies, nenhuma mudança nos valores foi detectada. No entanto, no caso da sena, uma variação foi observada. Constatou-se também que este período era correspondente à maior atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase.

Zawadzki-Baggio (1994), analisando os produtos de biossíntese das mesmas espécies, não encontrou diferenças significativas nas relações man:gal para as três espécies, no entanto, a estrutura fina dos produtos, a nível de distribuição de galactose ao longo da cadeia de manose, mostrou variação, conforme distintas quantidades de oligossacarídeos obtidos pela hidrólise dos produtos, sugerindo um controle a nível de especificidade das enzimas.

Com relação ao teor de proteínas, foi observado que os resultados, em torno de 10%, para as GMs de *Cyamopsis tetragonolobus* e *C. fastuosa* estão de acordo com os valores mostrados por Herald (1986a) e Tavares (1994) para estas mesmas espécies e, por Ganter (1988), Leitner (1991) e Petkowicz (1993) para a *Mimosa scabrella*, *Stryphnodendron barbatiman* e *Schizolobium amazonicum*, respectivamente.

Já para a *L. leucocephala* obteve-se um valor bastante alto, em torno de 30%. Este resultado condiz com os teores de proteína encontrados geralmente nas folhas e hastes da planta, motivo pelo qual esta espécie é utilizada como banco de proteínas (SÁ, 1997). Valores acima da média foram obtidos por Kappor; Baneiji e Prakash (1992) para a mesma espécie e outras como *Acacia catechu*, *Cassia occidentalis* e *Dalbergia sissoo*, onde as porcentagens de proteína foram de 19,2, 39,6, 30,9 e 55,9%, respectivamente.

Os teores de proteína para as três galactomananas, mais altos quando utilizado o método de Hartree (Tabela 1, pág. 27), podem ser explicados pela interferência de outros componentes que possam estar presentes, como certos aminoácidos ou outros componentes com núcleos aromáticos os quais também interagem com os reagentes utilizados nesse método de determinação de proteína.

Pela análise do índice de refração em diferentes concentrações foi obtido  $dn/dc$  de 0,125, 0,127 e 0,135 mL.g<sup>-1</sup>, para as amostras de GMs de *Cyamopsis tetragonolobus*, *C. fastuosa* e *L. leucocephala*, respectivamente. Estes foram utilizados para o cálculo da massa molar destes biopolímeros (Tabela 1, pág. 27), que foi determinada pelo método de difusão ou espalhamento de luz. Através desse método obteve-se os resultados de massa molar ponderal média ( $\bar{M}_w$ ) e da massa molar numérica média ( $\bar{M}_n$ ). A razão destes dois valores fornece a homogeneidade do tamanho molecular ou o grau de polidispersão.

Atribui-se um alto grau de homogeneidade para proteínas e polissacarídeos que apresentam massa molar ponderal média ( $\bar{M}_w$ ) e massa molar numérica média ( $\bar{M}_n$ ) quase idênticas. A medida que a razão  $\bar{M}_w/\bar{M}_n$  aumenta, a polidispersão também aumenta (DEA e MORRISON, 1975). Para todas as GMs analisadas neste trabalho a relação  $\bar{M}_w/\bar{M}_n$  foi superior a 1, indicando polidispersidade dos polímeros ou presença de uma família de moléculas com a mesma estrutura, mas com grande variação de massas molares.

Em estudos realizados Tavares (1994) para a galactomanana de *C. fastuosa*, foi indicado valor de massa molar de 562.056. Resultado semelhante ao encontrado em nossas análises. Dey (1978) e Ono (2004), para as galactomananas de *Cyamopsis tetragonolobus* e *L. leucocephala* obtiveram massas molares de 200.000 g.mol<sup>-1</sup> e 985.000 g.mol<sup>-1</sup>,



respectivamente. Resultados inferiores aos obtidos no presente trabalho. Pode-se sugerir que a origem das sementes, forma de extração e purificação, bem como o solvente e a metodologia usados nas análises podem interferir no valor de massa molar.

Na Figura 6, apresenta-se o perfil de eluição das galactomananas de *Cyamopsis tetragonolobus*, *C. fastuosa* e *L. leucocephala* utilizando-se como detectores o espalhamento de luz e o índice de refração. Observa-se a presença de um contaminante (\*), próximo do volume total da coluna de GPC. Uma vez que fora detectado pelo índice de refração, o qual pode ser que possua composição carboidrática. Sua porcentagem para as três galactomananas analisadas é inferior à 5% do total de açúcares sendo, portanto, desconsiderado. O pico após 42 minutos refere-se ao volume total da coluna, sendo relativo a eluição de solvente.

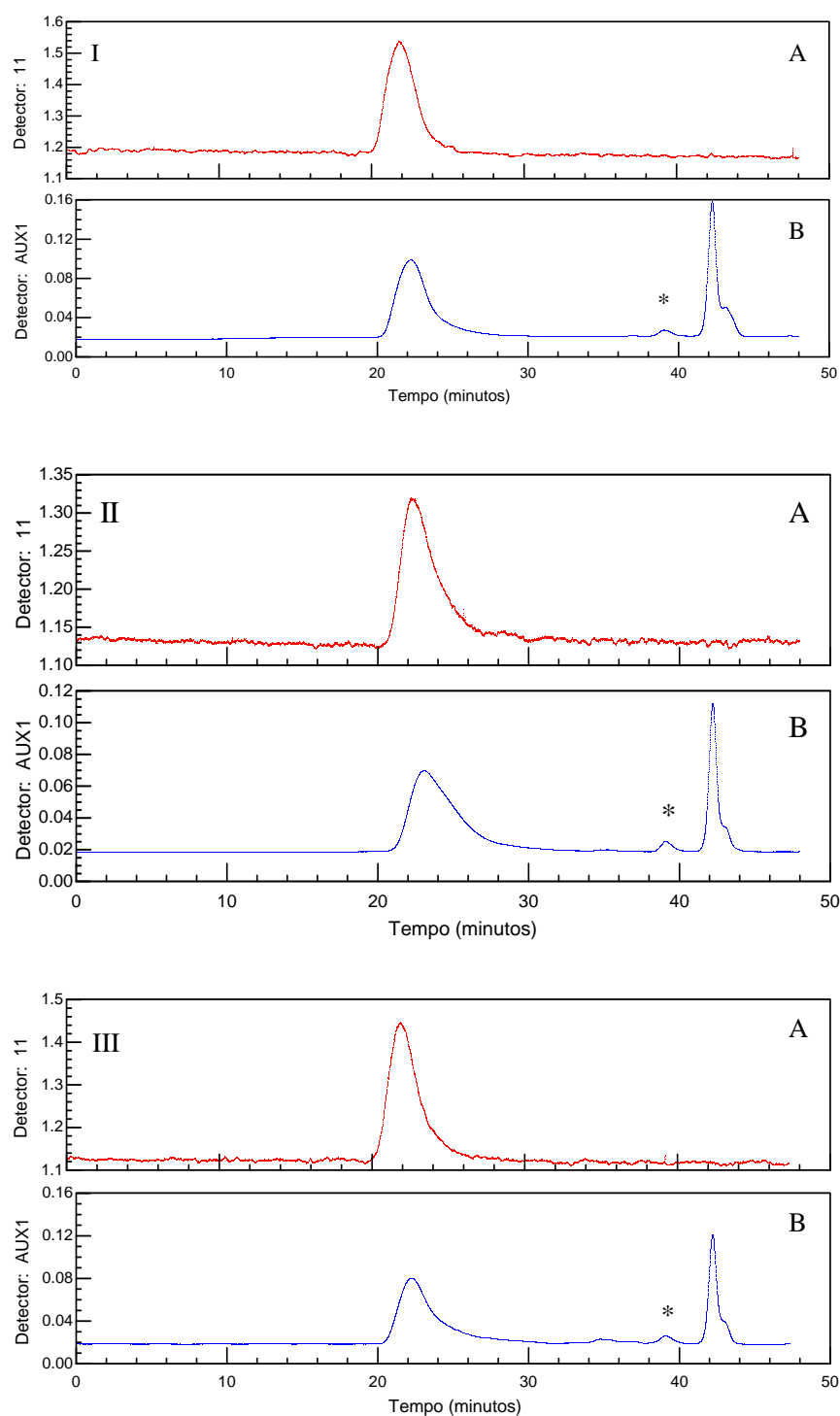


FIGURA 6 - PERFIL DE HPSEC-MALLS PARA: (I) GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Cyamopsis tetragonolobus*, (II) GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Cassia fastuosa* E (III) GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Leucaena leucocephala*. (A) DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ E (B) DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.

## 4.2.2. Análises Reológicas

### 4.2.2.1. Medidas relativas não oscilatórias dos sistemas com ágar e misturas ágar:galactomanana de guar

Em ensaios preliminares realizados em sistema estático (0,2 rpm) foi avaliado o efeito de várias misturas de ágar:GM de guar sobre a viscosidade aparente dos meios de cultura (Figura 7). Os resultados revelaram que a melhor interação entre esses polissacarídeos ocorreu para as misturas com até 17% de substituição (5,00 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 1,00 g.L<sup>-1</sup> de GM de guar). Os valores de viscosidade aparente obtidos foram mais altos que os obtidos para o gel somente com ágar (6 g.L<sup>-1</sup>), indicando que a substituição parcial de um polissacarídeo que normalmente forma gel, por uma substância não geleificante, nesse caso a GM, resulta em uma forte interação sinérgica entre os polissacarídeos, como relatado por outros autores como Baker; Carrow e Woodmansee (1949), Deuel e Neukon (1954), Dea e Morrison (1975) e Viebke e Piculell (1992).

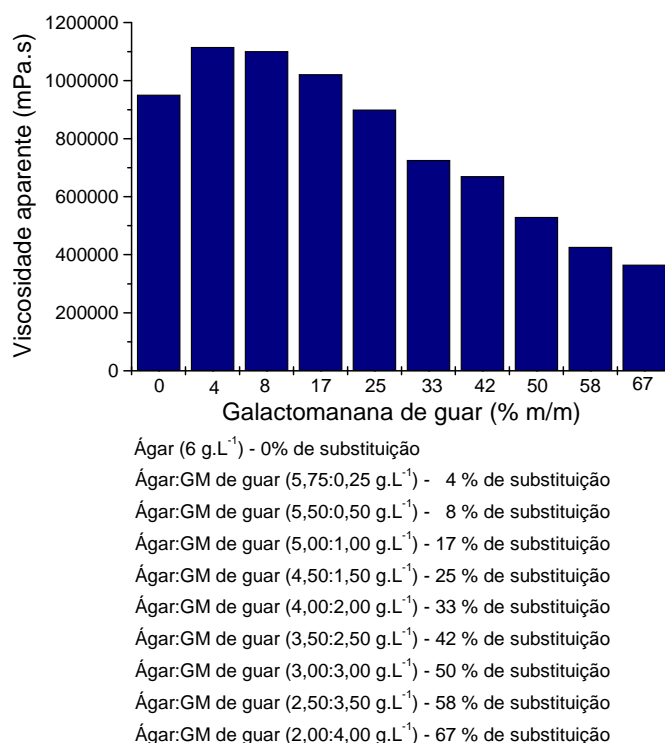


FIGURA 7 – VALORES DE VISCOSIDADE APARENTE DE GÉIS DE ÁGAR E MISTURAS ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR EM MEIO MS, USANDO RÊOMETRO BROOKFIELD LVDV-III, SPINDLE HELIPATH (T-F), 0,2 RPM, À 25°C.

Para as misturas de ágar:GM de guar nas proporções acima de 25% de substituição: (4,5 de ágar e 1,5 g.L<sup>-1</sup> de GM de guar) foi observada uma diminuição nos valores de viscosidade em relação ao meio padrão geleificado somente com ágar (6 g.L<sup>-1</sup>), o que pode ter sido causado pela maior dificuldade na interação entre os biopolímeros. Entretanto esses géis até uma substituição de 50% de ágar, ou seja, (3 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 3 g.L<sup>-1</sup> de GM de guar, m/m) se mostravam estáveis e não se romperam durante a manipulação.

Após essas análises reológicas, três misturas de ágar:GM de guar (83:17, 67:33 e 50:50%) foram escolhidas para testes preliminares de cultura *in vitro* (pág. 54), sendo que, 17% de substituição mostrou viscosidade aparente semelhante à do ágar, e 50% apresentou viscosidade inferior, mas com resistência mínima necessária para manter os tecidos vegetais na superfície do meio. O efeito dessas misturas como agentes geleificantes em cultivo de explantes de tabaco foi comparado com o uso do ágar à 6 g.L<sup>-1</sup>.

Após os testes iniciais de cultivo, a mistura ágar:GM de guar (3:3 g.L<sup>-1</sup>, m/m), que apresentou os melhores resultados de propagação (Tabela 3, pág. 58), foi escolhida para outras análises reológicas e para outros cultivos *in vitro*. Além da GM de guar foram testadas também misturas de ágar:GM de cássia e ágar:GM de leucena na mesma proporção.

#### **4.2.2.2. Medidas dinâmicas absolutas não oscilatórias dos sistemas com ágar e misturas ágar:galactomanana**

Um estudo dos parâmetros reológicos por métodos dinâmicos absolutos não oscilatórios (0,2 à 600 s<sup>-1</sup>) de misturas de ágar e diferentes GMs realizado em Reômetro Brookfield (Tabela 2) revelaram que a melhor interação, em termos de resistência de gel, aconteceu no meio geleificado com ágar e GM de cássia. Isto mostrou que a GM menos substituída por galactose promove uma melhor interação como citado na literatura (DEA e CLARK, 1986; DEA, 1987).

Turquois; Taravel e Rochas (1993) estudaram a sinergia de agarose e galactomanana de alfarroba, e concluíram que as propriedades sinérgicas destes sistemas podem ser descritas, principalmente, pela estrutura do gel, envolvendo uma dupla rede definida pelas zonas de junção específicas, ocorrendo por via das unidades da manose não substituídos na cadeia de GM. Em geral, a mais efetiva GM na formação de gel, interagindo com agarose e xantana, são aquelas nas quais a manose da cadeia principal carrega a menor quantidade de unidades de D-galactopiranosil. Entretanto, também a forma de distribuição de grupos D-

galactosil ao longo da cadeia principal, pode ter um significativo efeito nas propriedades de interação das GMs (DEA e CLARK, 1986).

TABELA 2 - PARÂMETROS REOLÓGICOS DE MEIO MS PREPARADO COM ÁGAR, GALACTOMANANA E MISTURAS ÁGAR:GALACTOMANANA USANDO REÔMETRO BROOKFIELD LVDV-III, CONE-PLACA CP-52 e CONE COAXIAL SC4-18, À 25°C.

Agentes Geleificantes (g.L <sup>-1</sup> )	Parâmetros			
	Viscosidade plástica <sup>1</sup> (mPa.s)	Ponto de ruptura <sup>1</sup> (N.m <sup>-2</sup> )	Índice de consistência <sup>2</sup> (mPa.s)	Índice de fluxo <sup>2</sup>
Ágar				
3	1456	3,70	4768	0,12
6	10382	4,15	13690	0,52
Ágar:GM de Cássia				
0:3	8,0	0,10	19,35	0,86
0:6	38,0	0,12	62,70	0,89
3:3	5408	4,10	8599	0,32
Ágar:GM de Guar				
0:3	13,94	0,27	37,60	0,83
0:6	128,9	0,55	276,90	0,82
3:3	4573	3,93	7537	0,40
Ágar:GM de Leucena				
0:3	2,91	0,09	7,71	0,91
0:6	8,97	0,19	31,30	0,76
3:3	2636	3,81	6026	0,22

<sup>1</sup>Pela equação de Bingham

<sup>2</sup>Pela equação de Power Law (Lei das Potências)

Medidas de viscosidade de soluções de GM à 3 e 6 g.L<sup>-1</sup> indicaram comportamento pseudoplástico, no intervalo de taxa de cisalhamento analisado. Como relatado para outras soluções aquosas de polissacarídeos como xiloglucana, gelana e alginato de sódio (KRUMEL e SARKAR, 1975; KWON; FOSS e RHA, 1987; MARTIN, 2003).

Onogi et al. (1966) citado por Krumel e Sarkar (1975) mostraram que o gráfico de  $\log \eta / \log C$  em diferentes taxas de cisalhamento para uma solução polimérica consiste do cruzamento de duas linhas retas em um ponto chamado de concentração crítica. Soluções poliméricas a concentrações acima desta concentração crítica mostram características não Newtonianas ou pseudoplásticas, ao passo que a concentrações abaixo da concentração crítica, a viscosidade é muito menos dependente da taxa de cisalhamento. A presença dessa concentração crítica tem mostrado ser devido à formação de uma rede causada pelo emaranhamento (enovelamento) das moléculas de polímero em solução. De acordo com esta

teoria, à taxas de cisalhamento muito baixas, quando as moléculas estão orientadas ao acaso e muito emaranhadas, o gráfico de  $\log \eta / \log c$  deve indicar um repentino aumento na inclinação acima da concentração crítica. Como a taxa de cisalhamento está aumentando, as moléculas do polímero serão mais e mais orientadas e desemaranhadas pelas forças de cisalhamento e, a inclinação da linha do gráfico acima da concentração crítica deve ser diminuída, sendo que a razões de cisalhamento muito altas, quando as moléculas estão totalmente desemaranhadas, o gráfico deve mostrar uma linha reta contínua com o desaparecimento do ponto crítico. Segundo os autores, a razão das inclinações das linhas de  $\log \eta / \log C$  acima e abaixo do ponto crítico é, portanto, um importante parâmetro que descreve interações intermoleculares em soluções poliméricas.

Portanto, com o comportamento pseudoplástico podemos caracterizar que estamos trabalhando acima da concentração crítica.

Os géis resultantes entre as misturas de ágar e diferentes GMs apresentaram mais baixa viscosidade plástica, ponto de ruptura e índice de consistência, quando comparado ao meio correspondente preparado somente com ágar ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ) (Tabela 2). Esses resultados sugerem que géis menos rígidos foram obtidos.

Entre as soluções de GMs, a goma guar foi a que apresentou maiores valores para todos os parâmetros (Tabela 2), o que indica que as propriedades reológicas podem estar relacionadas com as características químicas como a massa molar e a porcentagem de carboidratos totais apresentada pelo biopolímero (Tabela 1, pág. 27). Esta relação já foi observada anteriormente em estudos realizados por Robson et al. citado por Enriquez et al. (1989) estudando soluções de goma guar com diferentes massas moleculares, Sharman; Richards e Malcolm (1978) comparando propriedades hidrodinâmicas de soluções de GMs obtidas a partir de diferentes fontes e por Krumel e Sarkar (1975) em estudos das propriedades de escoamento de polissacarídeos com diferentes estruturas químicas. Todos os autores observaram que a GM de goma guar com maior massa molar mostrou viscosidade mais pronunciada.

#### 4.2.2.3. Medidas oscilatórias (propriedades viscoelásticas) dos sistemas com ágar e misturas ágar:galactomanana

A fim de analisar as propriedades viscoelásticas dos meios modificados onde o ágar foi parcialmente substituído por diferentes GMs, medidas reológicas foram realizadas em Reômetro Haake e os resultados foram comparados com os géis obtidos somente com ágar à 3 e 6 g.L<sup>-1</sup>. Para isso foi necessário primeiramente realizar experimentos de curva de deformação ( $\gamma$ ) (Figuras 8A-B; 9A-C) com o intuito de determinar a região do comportamento viscoelástico linear, ou seja, a região onde  $G'$  (módulo de cisalhamento elástico) e  $G''$  (módulo de cisalhamento viscoso) são independentes da tensão ou deformação aplicadas ao sistema (BARNES; HUTTON e WALTERS, 1989).

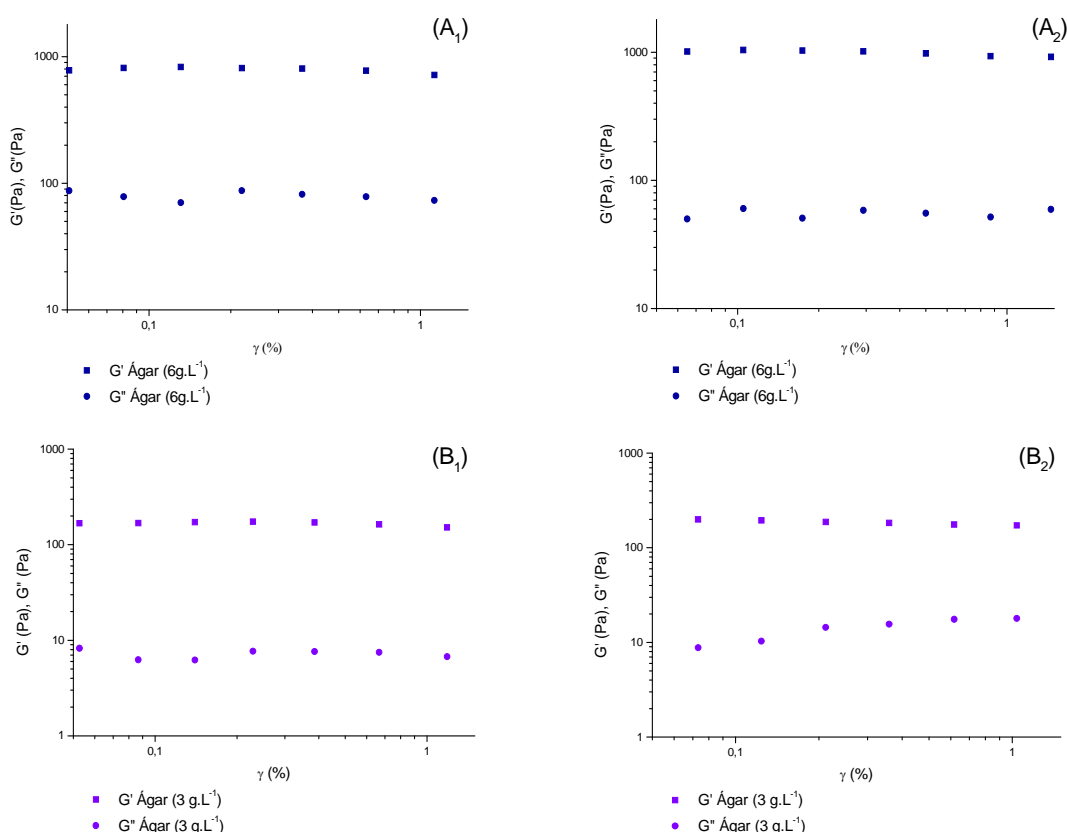


FIGURA 8 – MÓDULO DE CISALHAMENTO ELÁSTICO ( $G'$ ) E MÓDULO DE CISALHAMENTO VISCOSO ( $G''$ ) EM FUNÇÃO DA PORCENTAGEM DE DEFORMAÇÃO ( $\gamma$ ) DA REGIÃO DO COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA MEIO MS GELEIFICADO COM: (A) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>), (A<sub>1</sub>) FREQUÊNCIA DE 0,1 HZ E (A<sub>2</sub>) FREQUÊNCIA DE 10 HZ; (B) ÁGAR (3 g.L<sup>-1</sup>), (B<sub>1</sub>) FREQUÊNCIA DE 0,1 HZ E (B<sub>2</sub>) FREQUÊNCIA DE 10 HZ, À 25°C.

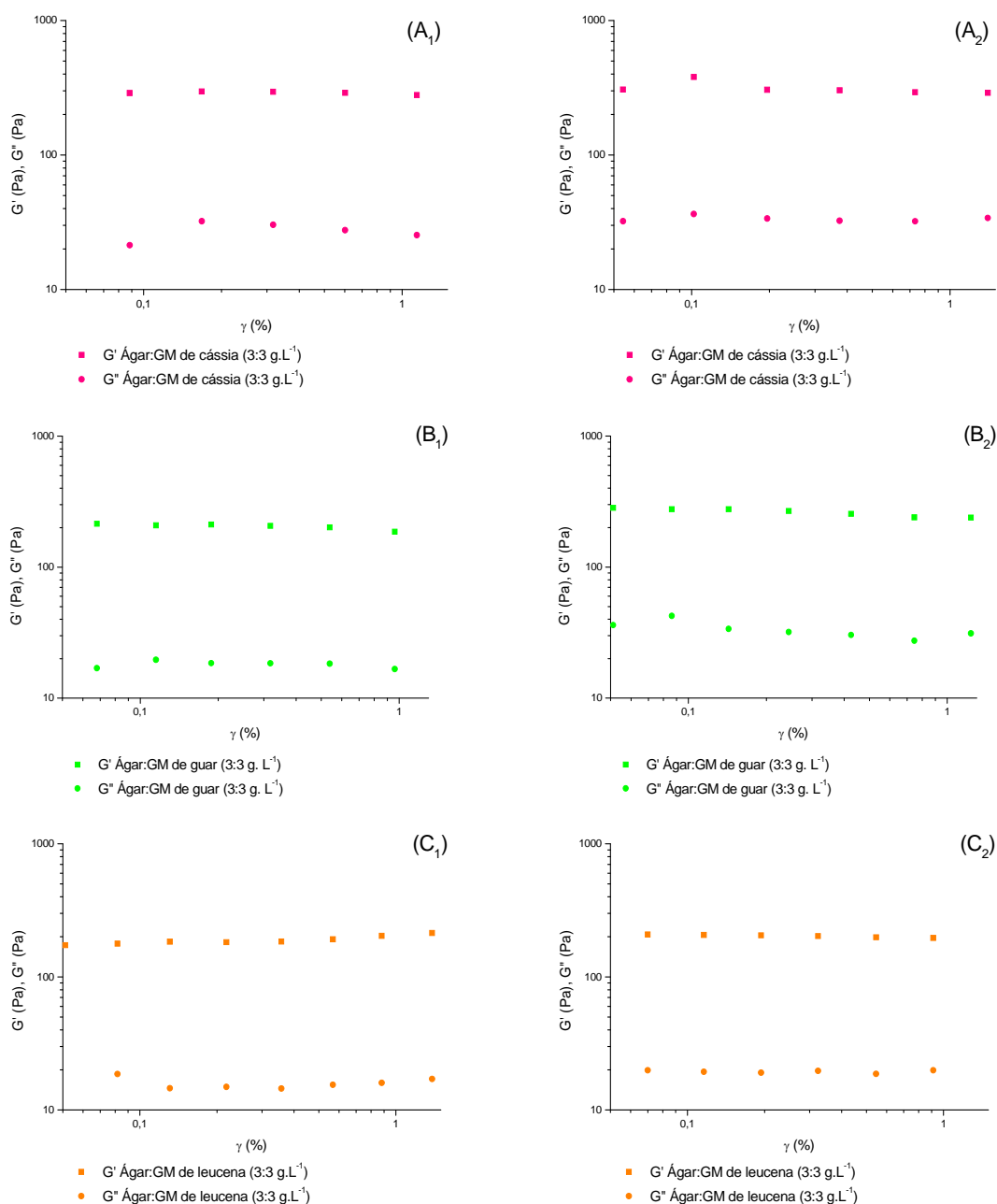


FIGURA 9 – MÓDULO DE CISALHAMENTO ELÁSTICO ( $G'$ ) E MÓDULO DE CISALHAMENTO VISCOZO ( $G''$ ) EM FUNÇÃO DA PORCENTAGEM DE DEFORMAÇÃO ( $\gamma$ ) DA REGIÃO DO COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA MEIO MS GELEIFICADO COM A MISTURA: (A) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), (A<sub>1</sub>) FREQUÊNCIA DE 0,1 HZ E (A<sub>2</sub>) FREQUÊNCIA DE 10 HZ; (B) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>), (B<sub>1</sub>) FREQUÊNCIA DE 0,1 HZ E (B<sub>2</sub>) FREQUÊNCIA DE 10 HZ; (C) ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), (C<sub>1</sub>) FREQUÊNCIA DE 0,1 HZ E (C<sub>2</sub>) FREQUÊNCIA DE 10 HZ, À 25°C.



Logo, na região de viscoelasticidade linear (deformação entre 0,30 e 0,60%), misturas de ágar e GM de guar, cássia ou leucena indicaram valores de  $G'$  entre 22 a 49 vezes mais altos do que  $G''$ , para todo o intervalo de frequências testadas (0,05-10 Hz). Os resultados mostraram que as misturas têm um caráter sólido, expresso pelo módulo de cisalhamento elástico ( $G'$ ), muito mais importante que seu comportamento como líquido, expresso pelo módulo de cisalhamento viscoso ( $G''$ ) indicando portanto que géis verdadeiros são formados. Perfis semelhantes foram obtidos para os géis de ágar à 3 e 6 g.L<sup>-1</sup>, cujos valores de  $G'$  estão entre 20 e 71 vezes mais altos que aqueles de  $G''$  para as mesmas frequências analisadas (Figura 10).

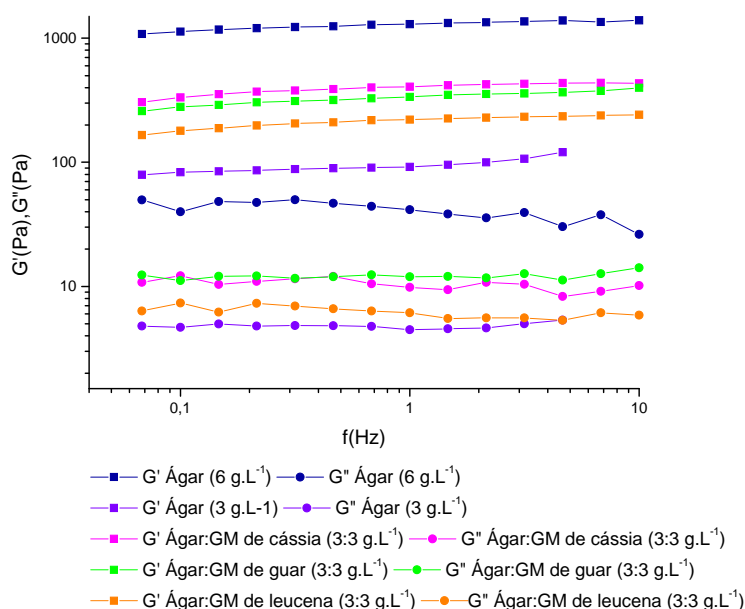


FIGURA 10 - MÓDULO DE CISALHAMENTO ELÁSTICO,  $G'$  (■) E MÓDULO DE CISALHAMENTO VISCOSO,  $G''$  (●), VERSUS FREQUÊNCIA ( $f$ ) PARA MEIO MS BASAL GELEIFICADO COM: ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR (3 g.L<sup>-1</sup>), MISTURAS ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) USANDO REÔMETRO HAAKE, RS-75, COM SENSOR C60/2<sup>o</sup> Ti, À 25°C, EQUIPADO COM SOFTWARE HAAKE.

Os valores dos módulos de cisalhamento complexo ( $G^*$ ) que correspondem a somatória do módulo de cisalhamento elástico ou de armazenamento ( $G'$ ) e módulo de cisalhamento viscoso ou de perda ( $G''$ ), maiores para o sistema ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) mostraram que a resistência total à deformação desse meio é maior que a dos meios modificados.

Em todos os experimentos, os valores de log da viscosidade dinâmica complexa ( $\eta^*$ ) versus velocidade angular ( $\omega$ ) diminuem linearmente, o que é um comportamento típico de um gel forte (REES, 1969). Os valores de  $\eta^*$  maiores para o gel de ágar à 6 g.L<sup>-1</sup> mostram a obtenção de um sistema mais rígido. Entre os meios modificados um valor de  $\eta^*$  mais alto foi observado onde o ágar foi parcialmente substituído por GM de cássia. O resultado para o ágar à 3 g.L<sup>-1</sup> mostrou um gel menos rígido que o das misturas ágar:GM (Figura 11).

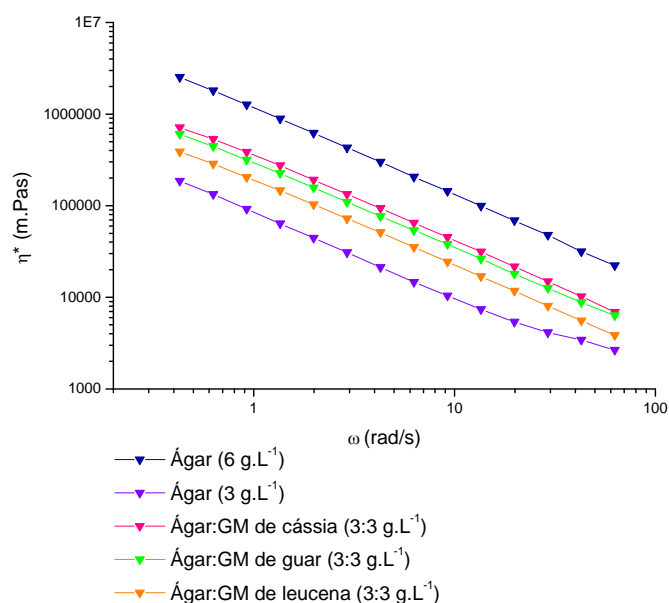


FIGURA 11 - VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA,  $\eta^*$  ( $\sigma$ ) VERSUS VELOCIDADE ANGULAR,  $\omega$ . PARA MEIO MS BASAL GELEIFICADO COM: ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR (3 g.L<sup>-1</sup>), MISTURA ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) USANDO REÔMETRO HAAKE, RS-75, COM SENSOR C60/2° Ti, À 25°C, EQUIPADO COM SOFTWARE HAAKE.

Na Figura 12 são mostrados os valores de  $\tan \delta$  que expressam a relação  $G''/G'$  e são utilizados para comparar a razão entre a energia dissipada e aplicada nos sistemas. Quanto menor for o seu valor, maior caráter viscoelástico terá o sistema. Foi observado pelo perfil mostrado na Figura 12 que o meio preparado somente com ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) promoveu melhor característica de sólido, ou seja, gel mais forte foi formado ( $\tan \delta = 0,035$ ). Para os sistemas contendo as misturas não houve diferença significativa entre os valores de  $\tan \delta$ .

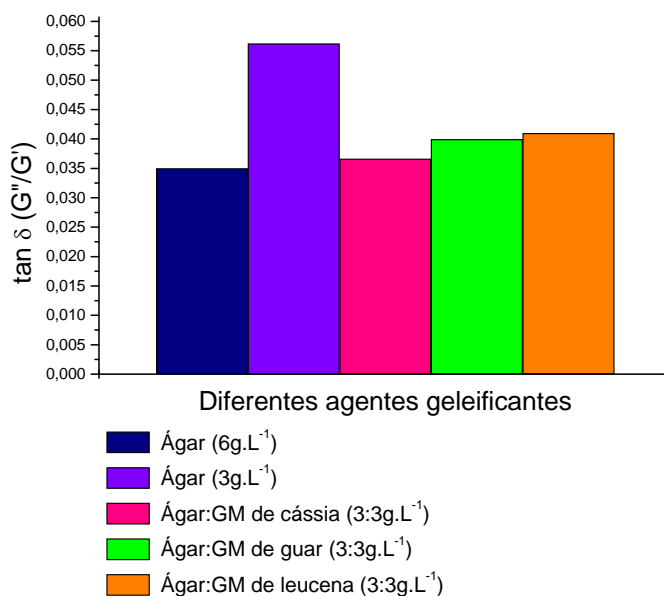


FIGURA 12 – RELAÇÃO  $\tan \delta (G''/G')$  PARA MEIO MS BASAL GELEIFICADO COM: ÁGAR (6g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR (3g.L<sup>-1</sup>), MISTURA ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3g.L<sup>-1</sup>), À 0,1 Hz, 25°C.

Estes parâmetros podem ser relacionados com aqueles valores obtidos para viscosidade plástica, índice de consistência e ponto de ruptura (Tabela 2, pág. 34) onde um melhor caráter sólido foi observado na sequência  $\text{ágar (6 g.L}^{-1}) > \text{ágar /GM de cássia (3:3 g.L}^{-1}) > \text{ágar:GM de guar (3:3 g.L}^{-1}) > \text{ágar:GM de leucena (3:3 g.L}^{-1}) > \text{ágar (3 g.L}^{-1})$ . A menor solidificação para o sistema contendo GM de leucena poderia ser decorrente do alto teor proteico. Experimentalmente, géis feitos com ágar à 3 g.L<sup>-1</sup> não permitiram manter os explantes na superfície do meio de cultura, e foi observado a presença de sinerese.

#### 4.2.3. Testes de difusão

Como observado nos resultados apresentados na Figura 13, houve maior difusão de azul de metileno nos meios onde as misturas ágar:GM foram utilizadas como agentes geleificantes, com diferença significativa em relação ao meio geleificado com ágar somente, no qual a velocidade de difusão foi mais lenta. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados por Ackers e Steere (1962) que mostraram que a separação e a difusão de um soluto diminuem com o aumento do tamanho das partículas desse soluto e/ou com o aumento na

força de gel. Assim, uma melhor difusão de água e de outros componentes (sais, vitaminas, fitorreguladores) pode ocorrer em meios modificados formulados com as misturas de ágar:GM.

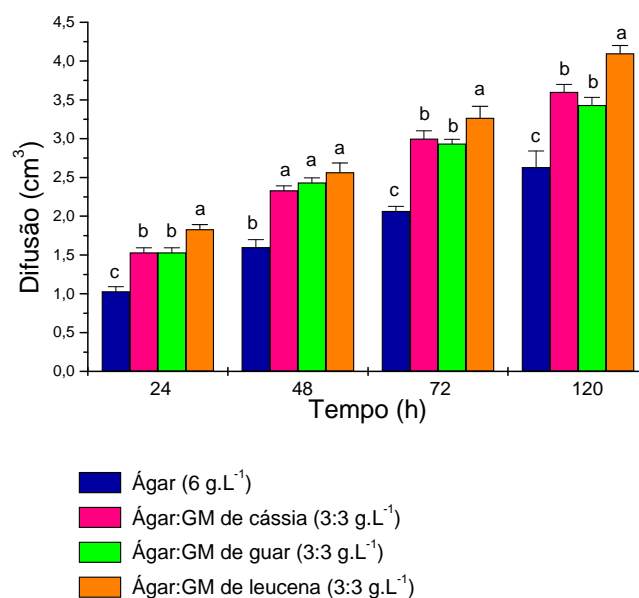


FIGURA 13 – DIFUSÃO DE AZUL DE METILENO EM MEIO GELEIFICADO COM: ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) OU ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>), À 25°C.

### 4.3. CONCLUSÕES

Os rendimentos de 31 e 37% para as galactomananas de *L. leucocephala* e *C. fastuosa*, respectivamente, podem ser considerados altos em comparação com os resultados para as mesmas espécies relatados na literatura;

A razão molar Man:Gal (3:1) mostrou que a galactomanana de cássia é a menos substituída. Através de análises de HPSEC-MALLS observou-se que todos os bipolímeros são formados por uma família polidispersa de polissacarídeos associados a proteínas;

As análises reológicas em sistema não oscilatório mostraram que as melhores interações ocorreram nos meios com até 17% de substituição de ágar por galactomanana de guar, cujos valores de viscosidade aparente foram mais altos que aqueles obtidos para o gel formulado somente com o ágar (6 g.L<sup>-1</sup>). Misturas de ágar e diferentes galactomananas revelaram que a melhor interação, em termos de rigidez de gel, aconteceu no meio geleificado com ágar:galactomanana de cássia, confirmando que a melhor sinergia ocorre com GMs menos substituídas. Medidas de viscosidade plástica e índice de consistência foram menores nos meios modificados. As medidas do ponto de ruptura mostraram que o emprego de uma força de até 3,8 N/m<sup>2</sup> aplicada sobre a superfície dos meios faz com que mostrem caráter de sólido e não fluam. Testes na região viscoelástica linear mostraram a formação de géis verdadeiros entre as misturas ágar:galactomanana (3:3 g.L<sup>-1</sup>). Entretanto, os meios modificados originaram géis menos rígidos em relação ao controle;

A maior difusão do azul de metileno ocorreu nos meios modificados indicando que, em cultura de tecidos, uma maior quantidade de água e nutrientes nesses meios menos rígidos, também, poderá ser levada aos explantes.

## 5. MICROPROPAGAÇÃO

### 5.1. REVISÃO DA LITERATURA

A micropropagação é uma importante área da Biotecnologia, em conjunto com outras duas: DNA recombinante e fermentação (CID, 2001). Esse processo pode ser considerado como uma extensão dos mais tradicionais métodos de propagação de plantas (SMITH e DREW, 1990).

Entre as inúmeras vantagens da micropropagação, destacam-se a manutenção do genótipo e do fenótipo de híbridos, mutações ou variantes genéticos selecionados, e o excelente estado fitossanitário das plantas obtidas (GIACOMETTI, 1990), já que é efetiva para produzir quantidades comerciais de propágulos livres de patógenos (FULLER e GALLON, 1995). Este método da cultura de tecidos tem tornado possível clonar em grande escala muitas espécies selecionadas de plantas que encontram-se em extinção, ou genótipos difíceis de serem propagados (RODRIGUEZ e VENDRAME, 2003). Com um investimento relativamente pequeno em espaço, suporte técnico e materiais, é possível produzir milhões de plantas com alta qualidade e geneticamente uniformes. (FASOLO e PREDIERI, 1988).

A primeira planta livre de vírus propagada comercialmente, foi o *Cymbidium* (orquídea) por meio da cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos (MOREL, 1960). Mais tarde, Smith e Murashige (1970), conseguiram desenvolver plantas inteiras a partir de meristemas apicais (sem primórdios foliares) em meio de cultura contendo sais minerais e vitaminas, enriquecido com fitorreguladores. A técnica também se tornou útil para espécies como batata (*Solanum tuberosum*), lírios, tulipas, alho (*Allium sativum*), mandioca (*Manihot esculenta*) e batata-doce (*Ipomea batatas*) e outras que são normalmente propagadas vegetativamente (FULLER e GALLON, 1995; TORRES; CALDAS e FERREIRA, 1998). Batata inglesa, por exemplo, é propagada através de brotos do tubérculo, um sistema que prontamente transmite vírus à próxima geração; a micropropagação a partir de cultivo de meristema provou ser um modo efetivo para isolar linhagens livres de vírus (FULLER e GALLON, 1995).

Em 1991, a produção mundial de plantas micropropagadas foi estimada em 600 milhões de plantas, principalmente nas categorias de espécies ornamentais e frutíferas. As espécies freqüentemente cultivadas são *Ficus*, *Syngonium*, batata, morango, *Spathiphyllum* e *Gerbera* (WERBROUCK e DEBERGH, 1994). Além disso, esta técnica é extensivamente

usada na produção de espécies florestais. Aqui, os propágulos são gerados principalmente da cultura de brotos axilares e adventícios. Um caminho semelhante tem sido aplicado a cultivares de macieira (*Malus*), pêssego (*Prunus*) e pêra (*Pyrus*) (DRUART, 2003). A maioria das frutíferas de clima temperado são altamente heterozigotas, não se desenvolvendo com sucesso a partir de sementes, mas sim mediante a propagação vegetativa. Enraizamento de microestacas em cultura *in vitro* é atualmente um procedimento rotineiro em muitos laboratórios comerciais (FULLER e GALLON, 1995).

Conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida por: proliferação de gemas axilares; indução de gemas adventícias e embriogênese somática (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A formação de calo pode preceder os processos embriogênicos e de formação de brotações adventícias. As brotações adventícias e axilares devem posteriormente emitir raízes adventícias para obtenção de plantas (MURASHIGE, 1977). Na técnica mais comum colocam-se tecidos meristemáticos em um meio de cultura que reduz a dominância apical e estimula-se o desenvolvimento de brotos axilares. Os brotos novos podem ser separados e subcultivados para produzir mais brotos axilares, ou colocados em um meio de cultura que estimule o enraizamento. Alternativamente, podem ser usados tecidos para estabelecer cultivo de calos, os quais podem ser então induzidos para formar raízes e brotos.

**A proliferação de gemas axilares** envolve o isolamento de órgãos meristemáticos pré-formados (normalmente gemas axilares) e a quebra de dominância apical com a aplicação de citocinina exógena. As gemas axilares que, naturalmente, se formam nas inserções das folhas são estimuladas a crescer, dando origem a novas partes aéreas que, por sua vez, repetem o mesmo processo. Tufos de partes aéreas são assim formados, os quais são subdivididos em conjuntos menores, ou cada parte aérea é isolada das demais para a formação de novos explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). As partes aéreas produzidas são então separadas e enraizadas para produzir plantas (PHILLIPS e HUBSTEMBERGER, 1995). Muitas plantas ornamentais e espécies lenhosas são propagadas comercialmente pela proliferação de gemas axilares (HIRIMBUREGAMA e GAMAGE, 1995; MAO et al., 1995, ECHEVERRIGARAY; MOSSI e MUNARI, 1998; GUERRA et al., 1999; MODGIL; SHARMA e BHARDWAJ, 1999).

**A organogênese direta** refere-se ao surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vitro*, mas que, em geral, não se expressa. Esses tecidos incluem o câmbio vascular, base de pecíolo em dicotiledôneas, base de folhas e

escamas em bulbos de monocotiledôneas e segmentos de raízes, entre outros. É facilmente induzida em entrenós e segmentos de gavinha de maracujá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), em meio MS na presença de BA, e as gemas regeneradas podem ser utilizadas em seguida para a multiplicação de plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A **organogênese indireta** ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo (PHILLIPS; HUBSTEMBERGER e HANSEN, 1995). A partir de células não organizadas do calo, surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas plantas aéreas. As multiplicações sucessivas podem ocorrer seja pela subdivisão do calo e manutenção de um sistema adventício, ou alterando-se o processo para a proliferação axilar sem a passagem por calo. Seja qual for o processo de multiplicação, as partes aéreas produzidas são individualizadas, enraizadas e transplantadas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Uma grande variedade de fatores biológicos, físicos e químicos afetam o padrão específico de organogênese e sua extensão (THORPE, 1994). A extensão de pré-determinação ou desempenho para morfogênese depende de tipo de tecido e do fundo genético da planta.

### 5.1.1. Meios de cultivo

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN e FERREIRA, 1990).

O meio MS desenvolvido por Murashige e Skoog (1962) é usado na cultura de tecidos na grande maioria das espécies. Outros meios, como o de White (WHITE, 1943) tem sido usados com êxito para algumas espécies. Formulações especialmente desenvolvidas para espécies lenhosas têm sido descritas por Quoirin e Lepoivre (1977), McCown e Lloyd (1981) e Anderson (1984). Os meios de Gamborg (GAMBORG; MILLER e OJIMA, 1968) e Schenk (SCHENK e HILDEBRANDT, 1972) foram formulados para induzir o crescimento de uma grande variedade de tecidos de ambas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Para o crescimento de tecido de *Fraxinus*, Wolter e Skoog (1966) modificaram um meio sintético formulado por Reinert e White (1956). Linsmaier e Skoog (1965) desenvolveram um meio semelhante ao MS exceto no conteúdo de componentes orgânicos.



#### 5.1.1.1. Componentes dos meios de cultivo

A composição do meio de cultura é um fator importante no estabelecimento de uma cultura *in vitro*. Condições de cultura que favorecem crescimento de calos podem não ser adequadas para a diferenciação de órgãos (NARAYANASWAMY, 1977).

Vários meios foram desenvolvidos por diversos pesquisadores para suprir exigências particulares de um tecido. Um meio padrão ou basal consiste em uma mistura equilibrada de macro e micronutrientes (sais de cloretos, nitratos, sulfatos, fosfatos e iodetos de Ca, Mg, K, Na, Fe, Mn, Zn, e B), vitaminas, uma fonte de carbono, fatores de crescimento orgânico (aminoácidos, uréia e peptonas), uma fonte de nitrogênio e fitorreguladores (NARAYANASWAMY, 1977). Outros componentes podem ser acrescentados para propósitos específicos. Eles incluem ácidos orgânicos e extratos de plantas como leite de côco desproteínizado, suco de tomate e suco de laranja, entre outros (GAMBORG; MÜLLER e OJIMA, 1968; NARAYANASWAMY, 1977).

##### ❖ Sais minerais

Os elementos minerais exigidos em maiores quantidades para o crescimento de plantas inteiras são incluídos nos meios nutritivos, na forma de sais inorgânicos, podendo o nitrogênio e o enxofre serem adicionados também, como componentes de suplementos orgânicos (aminoácido, por exemplo) (CALDAS; HARIDASAN e FERREIRA, 1990). Quando o nitrogênio é fornecido somente na forma de sais inorgânicos de amônio, as células *in vitro* apresentam sintomas de toxidez (GAMBORG, 1970; GAMBORG e SHYLUK, 1970). Entretanto, uma combinação das duas formas de nitrogênio, amônio e nitrato, estimula o crescimento de muitas espécies de plantas *in vitro* (SARGENT e KING, 1974).

##### ❖ Carboidrato

A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo que esse açúcar permite as mais altas taxas de crescimento da maioria das espécies (CALDAS; HARIDASAN e FERREIRA, 1990).

## ❖ Fitorreguladores

A composição e a concentração de fitorreguladores no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (CALDAS; HARIDASAN e FERREIRA, 1998). Assim como nos animais, o desenvolvimento das plantas é fundamentalmente controlado por reguladores de crescimento ou hormônios. Esses compostos estão diretamente envolvidos no controle da organogênese (SKOOG e MILLER, 1957; THORPE, 1982; TORREY, 1985; MOHNEN; EBERHAND e MARFA, 1990). Desse modo, apesar das descobertas feitas até a década de 30, principalmente no campo da nutrição mineral, terem possibilitado o crescimento de órgãos isolados *in vitro* (WHITE, 1934), a indução deles em condições artificiais só foi possível a partir de um conhecimento mais aprofundado sobre a natureza dos hormônios vegetais (PERES, 2002).

Durante a década de 50, a equipe do Dr. Folk Skoog fez descobertas fundamentais para a indução e a manutenção da organogênese *in vitro*. Naquela época já se conhecia o ácido indol-3-acético (AIA), uma auxina isolada em 1934. O AIA era utilizado em meios nutritivos juntamente com constituintes complexos, como extrato de levedura e água de côco, os quais pareciam conter algo também essencial à organogênese. Essa substância essencial para a divisão celular foi finalmente isolada por Carlos Miller, em 1955 e denominada citocinina (PERES, 2002). A chamada citocinina, assim denominada por promover, juntamente com a auxina, a citocinese, propiciou, finalmente, as bases da organogênese *in vitro*. Skoog e Miller (1957) demonstraram que a formação de caules e raízes *in vitro*, era controlada pelas concentrações relativas entre auxina (AIA) e citocinina (cinetina). Meios de cultura contendo um balanço auxina/citocinina favorável à auxina (altos níveis de auxina) promoveram a formação de raízes em calo de tabaco (*Nicotiana tabacum*). De modo inverso, balanços hormonais favoráveis à citocinina (concentrações altas de cinetina) fizeram com que fossem formadas gemas caulinares. Finalmente, balanços hormonais intermediários não levaram a uma diferenciação das células e sim a uma maior multiplicação delas e conseqüente crescimento do calo.

Werner e Boe (1980) mostraram que o uso da auxina AIB (ácido indol butírico) em uma concentração de 9,80  $\mu\text{M}$  foi eficiente no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M 7.

As auxinas e as citocininas são as classes de fitorreguladores mais utilizadas na cultura de tecidos (SKOOG e MILLER, 1957), entretanto outras têm sido usadas com resultados

positivos: as giberelinas (que atuam sobre a expansão e divisão celular); o ácido abscísico (utilizado como inibidor do crescimento) e etileno (produto natural do metabolismo vegetal que influi sobre o crescimento das plantas, maturação e envelhecimento de frutos (GASPAR et al., 1996).

Após subcultivos sucessivos, tecidos podem espontaneamente adquirir a capacidade de sintetizar fitorreguladores e dessa forma crescem em meios sem adição de hormônios. Tais tecidos são chamados “habituaados” (CHRISTOU, 1988). Tecidos habituaados são freqüentemente diferenciados. Tecidos de *Nicotiana bigelovii* cresceram sem fitorreguladores depois de cultura inicial em um meio com 2,4 D (BUIATTI e BENNICI, 1970).

### **5.1.2. Regeneração de plantas através de calos**

A cultura de tecidos de plantas oferece um novo caminho para a engenharia genética e para a bioquímica no melhoramento de cultivares (LARKIN e SCOWCROFT, 1981). O sucesso na transformação de plantas requer sistemas efetivos de regeneração (CHAUVIN et al., 1999). Uma exigência básica para um aplicação de cultura de tecidos é, muitas vezes, o estabelecimento de calos a partir de tecidos e regeneração de plantas intactas a partir desses calos (ZAMORA e SCOTT, 1983).

O calo é um tecido amorfo, formado quando células de plantas multiplicam-se de forma desordenada (GEORGE, 1993). É uma massa de células não diferenciadas do ponto de vista organogênico (brotos e raízes), que está em contínua proliferação celular (CID, 2001).

Dependendo da fonte do explante, componentes dos meios nutritivos, e duração do subcultivo, um calo pode consistir inicialmente em uma variedade de tipos e conteúdo de células, com diferentes tamanhos e formas de seus vacúolos e espessura da parede. Componentes lignificados, taninos e células de secreção podem estar presentes durante o processo de crescimento (NARAYANASWAMY, 1977).

Calos de diferentes espécies podem variar na textura, friabilidade e coloração. Podem ser amarelo pálido ou albinos. Em geral a pigmentação será igual ao tecido de origem do calo e isto pode desaparecer através de subcultivos repetidos (IBRAHIM; THAKUR e PERMANAND, 1971).

Um tecido organizado como uma folha, raiz ou um caule, pode ser totalmente transformado em um calo que rapidamente prolifera, e que se cultivado em um meio nutritivo

que contém fitorreguladores específicos poderá originar um broto, raiz ou até mesmo uma planta completa (NARAYANASWAMY, 1977).

Segundo Rout; Samantaray e Das (2000), a indução do crescimento do calo e subsequente diferenciação é realizada pela aplicação de fitorreguladores e do controle das condições no meio de cultura. Com o estímulo de substâncias de crescimento endógenas ou pela adição de fitorreguladores exógenos ao meio nutritivo, a divisão, crescimento celular e diferenciação são induzidos.

Muitos tecidos de origem diversa, foram estabelecidos em cultura e os fatores que controlam o crescimento e a diferenciação nos vários tecidos foram investigados por Vasil e Vasil (1972) e Murashige (1974). As interações entre os diferentes grupos de fitorreguladores (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno), cada um operando direta ou indiretamente, sozinhos ou em combinações sinérgicas, têm dado um discernimento no inter-relacionamento que existe entre células, tecidos e órgãos, e no desenvolvimento integrado de uma planta inteira (NARAYANASWAMY, 1977).

A regeneração ocorre em meios mais simples, necessários para uma cultura de tecido. Normalmente o meio contém elementos orgânicos e inorgânicos, além dos fitorreguladores. Cada tecido tem suas próprias exigências e às vezes adjuvantes (ingredientes) de crescimento menos definidos têm um papel na organogênese. O fenômeno, também, é dependente de vários outros fatores como fonte da qual origina-se o calo, seu genótipo e idade, e vários fatores físicos (NARAYANASWAMY, 1977).

Formação de broto seguida de enraizamento é característica de culturas que são isoladas de hipocótilo juvenil, caule e segmento de folha e, raramente, a partir de calos de raiz (com a exceção da cenoura), embora raízes isoladas em cultura deram origem a brotos como em tomate (NORTON e BOLL, 1954), *Convolvulus* (TORREY, 1958) e *Brassica* (BAJAI e NIETSCH, 1975).

Apesar da planta derivada de cultura de tecido clonado ser presumivelmente idêntica as células somáticas (assexuadas), as plantas regeneradas podem exibir variações significativas na sua morfologia e fisiologia. Isto é conhecido como variação somaclonal. A causa de variação somaclonal não está clara, mas envolve variação genética espontânea como resultado das condições de cultura. A variação somaclonal pode causar ocasionalmente resistência à doença ou alguma outra característica agrônômica útil (FULLER e GALLON, 1995).

A fonte do explante cultivado é importante na determinação do potencial regenerativo. Folhas e fragmentos de folha de muitas espécies de planta mostraram capacidade para formar

brotos adventícios: *Begonia* (SHIGEMATSU e MATSUBARA, 1972), *Echeveria elegans* (RAJU e MANN, 1970, 1971), *Helionopsis orientalis* (KATO e KAWAHARA, 1972), espécies das *Solanaceae* (GUPTA; GUHA e MAHESHWARI, 1966; ZENKTELER, 1972; PRABHUDESAI e NARAYANASWAMY, 1973), feijão-fradinho (INDIRA e RAMADASAN, 1967); outras fontes de explantes como secções de raízes de *Convolvulus* (BONNETT e TORREY, 1965) e *Linaria* (CHARLTON, 1965); cotilédone de *Biota* (KONAR e OBEROI, 1965), *Ilex* (HU e SUSSEX, 1971) e *Lactuca sativa* (DOERSCHUG e MILLER, 1967) também se mostraram aptas à regeneração.

Várias plantas medicinais são propagadas através de regeneração via calo, utilizando folhas como explante como, *Datura thapsi* (CACHO et al., 1991), *Lathyrus sativus* (ROY et al., 1991) e a *Centella asiatica* (PATRA et al., 1998), entre outras.

Concentração de açúcar e o agente geleificante utilizado são outros fatores que podem ter um papel determinante na organogênese.

Owens e Wozniak (1991) mostraram que a disponibilidade de água na superfície do gel é um fator determinante para o crescimento de calos de cana de açúcar em diferentes tipos de ágar. Além disso, o líquido liberado pelo gel durante o desenvolvimento do explante contribui muito para o crescimento do calo. Segundo Scholten e Pierik (1998a) para o desenvolvimento do calo o meio deve ser preparado com um gel mais fraco, que facilite a expansão e crescimento das células dos tecidos que estão sobre a superfície do meio, e melhore a difusão de água e nutrientes.

Koda et al. (1988) obtiveram maior quantidade de calos, frequência de regeneração (99%), tamanho de brotos e comprimento de raízes de repolho roxo quando goma gelana foi utilizada como agente geleificante. Já no meio onde o ágar foi utilizado, houve formação de calos em menor quantidade e a frequência de regeneração caiu para 30%.

### 5.1.3. Micropropagação de espécies lenhosas

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada há várias décadas e tem como objetivo básico o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação clonal de indivíduos superiores. As espécies lenhosas de interesse agrícola são basicamente constituídas pelas espécies frutíferas como macieira, pereira, pessegueiro, mangueira, cítricos, etc., bem como pelas espécies florestais como o eucalipto, as coníferas, a teca, etc. Outras espécies como o café, cacau, chá mate e outros também se enquadram neste grupo de espécies, além

das espécies produtoras de amêndoas como a castanha do Pará, o caju e a noz macadâmia. Desta forma, observa-se que as espécies lenhosas constituem um grupo de plantas extremamente importantes do ponto de vista econômico e social a nível mundial (TEIXEIRA, 2004).

A micropropagação comercial de frutíferas incrementou-se a partir da década de 70. Os procedimentos foram desenvolvidos para diversas espécies, inclusive para a macieira, a mais pesquisada nesse campo. Esse processo possibilita a obtenção de porta-enxertos e também cultivares comerciais já enraizados, evitando problemas de incompatibilidade de enxertia e de disseminação de vírus e outros patógenos durante a micropropagação (GRATAPAGLIA e MACHADO, 1998).

5.2. USO DE GALACTOMANANA COMO SUBSTITUTA PARCIAL  
DO ÁGAR NA ORGANOGENESE INDIRETA DE TABACO  
(*Nicotiana tabacum*) CV. AMARELINHO MAUS

### 5.2.1. INTRODUÇÃO

Plantas herbáceas pertencentes a família das Solanáceas (a maior parte das espécies do gênero *Nicotiana* ssp.) são nativas da América do Sul. O restante está distribuído através da América Central, oeste da América do Norte, Austrália e ilhas do Sul do Pacífico.

Muitas espécies não são cultivadas, no entanto, *Nicotiana tabacum*, e em uma menor proporção *Nicotiana rustica*, são cultivadas e chamadas de tabaco (CHAPLIN e BURK, 1980). São propagadas normalmente por meio de sementes, mas podem ser assexualmente propagadas por estacas ou brotos axilares (CHAPLIN e BURK, 1980).

Desde o princípio, *Nicotiana* spp. teve um papel central no desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos de plantas (HELGESON, 1980). Em 1939, White constatou que tecidos obtidos dos híbridos de *Nicotiana glauca* x *N. langsdorfii* poderiam ser cultivados indefinidamente em um meio nutritivo. Seus experimentos, junto com os realizados por Gautheret (1959) que usou cenoura, foram os primeiros sucessos de desenvolvimento de massas de tecidos não diferenciados *in vitro*.

Cultura de células isoladas de *Nicotiana* spp começaram a ser desenvolvidas ao longo dos anos 1950 e 1960. Vasil e Hildebrandt em 1965, demonstraram que a partir de uma célula somática poderia diferenciar plantas de tabaco. Takabe; Labib e Melchers (1971) isolaram protoplastos de folhas de tabaco que sofreram divisão mitótica e também regeneraram plantas. Logo, culturas de *Nicotiana* spp. podem ser úteis como modelo para desenvolvimento de técnicas para outras espécies e, como sistemas experimentais para estudos de fenômenos básicos vegetais.

O meio MS que foi desenvolvido por Murashige e Skoog (1962) para otimizar o crescimento de tecidos de *Nicotiana tabacum*, pode servir como meio básico para estudos do crescimento de células em meio sólido (HELGELSON, 1980).

Com o objetivo de testar um novo suporte para a cultura de tecidos em meio semi-sólido, foram realizados experimentos para avaliar o uso de misturas de ágar e galactomanana de guar em diferentes concentrações e com diferentes fitorreguladores e misturas de ágar e galactomanana de guar ou cássia na proporção de 3:3 g.L<sup>-1</sup> em comparação com ágar à 6 g.L<sup>-1</sup> na organogênese indireta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cultivar Amarelinho Maus.



## 5.2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.2.1. Material vegetal

Sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cultivar Amarelinho Maus, foram fornecidas pela Companhia Souza Cruz, Rio Negro, PR, Brasil.

### 5.2.2.2. Desinfestação e germinação das sementes

As sementes de tabaco foram desinfestadas por 30 segundos em etanol 70%, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% por 30 min, à 25°C. Após três lavagens com água destilada estéril, as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), solidificado com ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) sem fitorreguladores. Brotos foram subcultivados por duas vezes a cada 40 dias, antes de serem utilizados como fonte de explante.

Em todos os experimentos, os explantes iniciais foram constituídos de segmentos de folhas ( $\pm 1 \text{ cm}^2$ ) cortados de plântulas com 40 dias e incubados em placas de Petri (90 mm de diâmetro x 20 mm de altura) contendo 20 mL de meio de cultura.

### 5.2.2.3. Uso de diferentes concentrações de galactomanana de guar como substitutas parciais do ágar

Nesse experimento foram feitas substituições parciais de ágar por GM de guar, para verificar a possível influência da força do gel sobre o desenvolvimento de brotos de tabaco a partir de pedaços de folhas. Para estes experimentos foi utilizado meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 4,44  $\mu\text{M}$  de BA (Benziladenina) (MS<sub>1</sub>) onde foram testados como agentes geleificantes: ágar (6 g.L<sup>-1</sup>), ágar:GM de guar (5:1 g.L<sup>-1</sup>), ágar:GM de guar (4:2 g.L<sup>-1</sup>) e ágar:GM de guar (3:3 g.L<sup>-1</sup>), que indicam grau de substituição de ágar por galactomanana na ordem de 0, 17, 33 e 50%, respectivamente.

A eficiência dos agentes geleificantes foi avaliada pelo número médio de brotos por explante e pela massa fresca dos explantes depois de 30 dias em meio de cultivo.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro tratamentos. Cada tratamento foi formado por nove unidades experimentais, cada

unidade experimental sendo uma placa de Petri com 6 segmentos de folha, totalizando 54 segmentos por tratamento. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

#### **5.2.2.4. Indução de calos e brotos de tabaco**

Em experimentos independentes, os meios MS<sub>1</sub> e MS<sub>2</sub> foram utilizados para testes de indução de calos e brotos de tabaco. O primeiro meio de cultura consistiu em sais minerais e compostos orgânicos do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose suplementado com 4,44 µM de BA (MS<sub>1</sub>). O segundo meio de cultura continha sais minerais do meio MS, 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (STOLARZ; MACEWICZ e LÖRZ, 1991) e uma combinação de 4,44 µM de BA e 0,54 µM ANA (MS<sub>2</sub>). Para esses ensaios foram testados como agentes geleificantes: ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) ou ágar:GM de guar (3:3g.L<sup>-1</sup>) ou ágar:GM de cássia (3:3 g.L<sup>-1</sup>). Para controle foi utilizado o meio MS basal sem fitorreguladores (MS<sub>0</sub>), com ou sem GM como substituta parcial do ágar como agente geleificante.

A avaliação foi realizada pelo número médio de brotos por explante e pela massa fresca dos explantes, depois de 30 dias em meio de cultivo.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando-se três tratamentos. Cada tratamento com oito unidades experimentais, cada unidade experimental sendo uma placa de Petri com 6 segmentos de folha, totalizando 48 segmentos por tratamento no meio MS<sub>1</sub>. Os experimentos foram repetidos três vezes. No caso do meio MS<sub>2</sub> cada tratamento com sete unidades experimentais constituídas de 6 segmentos de folhas, totalizando 42 segmentos por tratamento. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

#### **5.2.2.5. Indução de raízes**

Brotos com um comprimento mínimo de 1 cm, obtidos no meio MS<sub>1</sub>, modificado ou não pela presença de GM, foram transferidos para frascos tipo pote (80 mm de diâmetro x 130 mm de altura), contendo 40 mL de meio de cultura. O meio utilizado para esta fase foi o MS sem fitorreguladores (MS<sub>0</sub>), geleificado com ágar ou mistura de ágar:GM de guar ou cássia.

Para avaliar a eficiência do meio de enraizamento, a porcentagem de brotos enraizados, o número médio de raízes e o comprimento médio das raízes foram registrados depois de 10 dias de cultivo.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando-se três tratamentos. Cada tratamento com oito unidades experimentais, cada unidade experimental sendo um frasco com 6 brotações, totalizando 48 brotações por tratamento. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

#### **5.2.2.6. Crescimento de plantas**

Para avaliar o crescimento das plantas, explantes foram mantidas no meio de enraizamento (MS<sub>0</sub>) durante 30 dias. Após este período foi avaliado o número de folhas e tamanho de folhas de tabaco por explante. O fluxograma básico da organogênese indireta de tabaco encontra-se na Figura 14.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando-se três tratamentos. Cada tratamento com oito unidades experimentais, cada unidade experimental sendo um frasco com 6 brotações, totalizando 48 brotações por tratamento. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

#### **5.2.2.7. Condições de cultura**

Para todos os ensaios, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura controlada de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  com luz fluorescente do tipo branca fria, intensidade de fluxo de fótons de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da UFPR.

#### **5.2.2.8. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa MSTATC (Michigan State University), versão 2.11. A homogeneidade das médias foi avaliada por análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

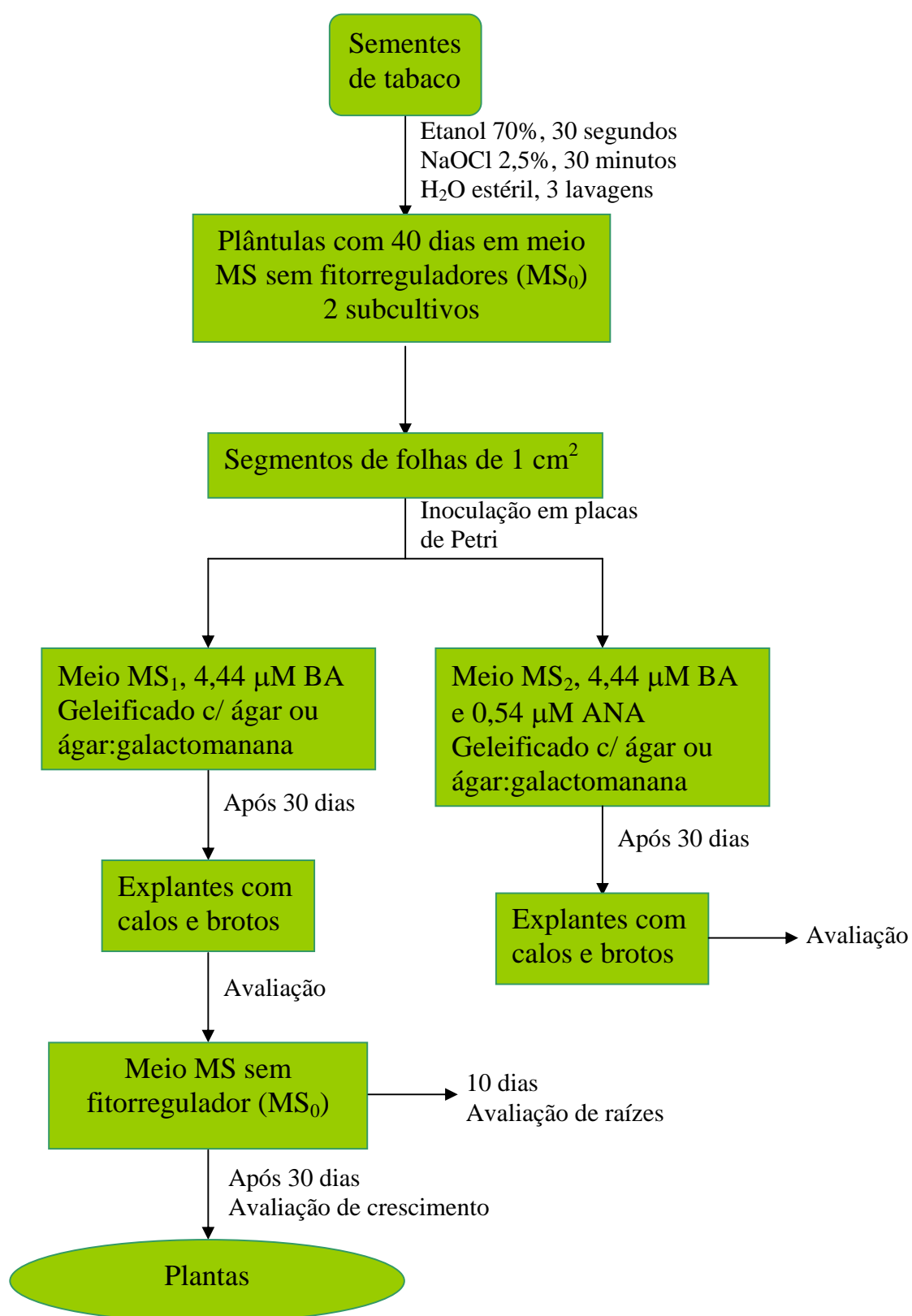


FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANOGÊNESE INDIRETA DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) CULTIVAR AMARELINHO MAUS.

### 5.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.2.3.1. Uso de diferentes concentrações de galactomanana de guar como substitutas parciais do ágar

Esse experimento foi utilizado como teste preliminar para avaliar qual seria o grau de substituição de ágar por GM mais favorável para a cultura de tecidos de tabaco. Após as análises reológicas (Figura 7, pág. 32), três graus de substituição do ágar por GM (17, 33 e 50%) foram escolhidos para testes de cultivo *in vitro*, sendo que 17% de substituição apresentou viscosidade aparente mais semelhante à do ágar, e 50% foi o grau de substituição máximo cujo gel apresentava resistência mínima necessária para manter os tecidos na superfície do meio.

Pela análise dos resultados, foi observado que o número médio de brotos foi inversamente proporcional à resistência à deformação do gel, sendo que géis menos rígidos onde o ágar foi substituído em maior quantidade (50%) apresentaram maiores médias para essa variável (Tabela 3), o que confirma que a menor rigidez do meio pode favorecer a organogênese em explantes de tabaco. Logo, a partir destes resultados iniciais foram feitos outros testes com tabaco e outras espécies com mistura ágar:GM (3:3 g.L<sup>-1</sup>).

TABELA 3 - EFEITO DO ÁGAR E MISTURAS DE ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR COMO AGENTES GELEIFICANTES NA ORGANOGÊNSE INDIRETA DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) CULTIVAR AMARELINHO MAUS EM MEIO MS CONTENDO 4,44 µM DE BA APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.

Concentração de Polissacarídeo (g.L <sup>-1</sup> )	Número médio de brotos por explante	Massa fresca dos explantes (g)
Ágar (6 g.L <sup>-1</sup> )	9,23 b	3,586 a
Ágar:GM de guar (5:1 g.L <sup>-1</sup> )	8,70 b	3,551 a
Ágar:GM de guar (4:2 g.L <sup>-1</sup> )	10,20 ab	3,593 a
Ágar:GM de guar (3:3 g.L <sup>-1</sup> )	12,48 a	3,903 a

Média de dois experimentos independentes ± desvio padrão. Foram calculadas médias de todos os brotos > 0,5 cm. Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes como indicado pelo teste de Tukey (p < 0,05).

### 5.2.3.2. Indução de calos e brotos em explantes foliares de tabaco

Após 30 dias da inoculação dos explantes nos meios de cultura MS<sub>1</sub> e MS<sub>2</sub> produziram-se calos compactos na borda dos explantes, tanto no meio geleificado com ágar quanto no meio contendo ágar:GM de guar ou ágar:GM de cássia. Na superfície desses calos ocorreu a formação de brotos com duas a quatro folhas, os quais não foram distribuídos uniformemente.

Nos meios MS<sub>1</sub>, o número médio de brotos por explante e a massa fresca foi maior nos meios onde o ágar foi parcialmente substituído por GM, se comparado ao meio solidificado com ágar somente (Tabela 4).

TABELA 4 - EFEITO DOS AGENTES GELEIFICANTES NA ORGANOGÊNESE DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) CULTIVAR AMARELINHO MAUS APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.

		Meio de cultivo	
		MS <sub>1</sub>	MS <sub>2</sub>
Número de brotos por explante	Ágar	8,83 ± 0,94 c	4,12 ± 0,43 b
	Ágar:GM de guar	13,30 ± 1,50 a	6,84 ± 1,06 a
	Ágar:GM de cássia	10,65 ± 0,59 b	7,51 ± 0,86 a
Massa fresca dos explantes (g)	Ágar	2,99 ± 0,24 b	2,11 ± 0,24 a
	Ágar:GM de guar	3,98 ± 0,29 a	2,24 ± 0,15 a
	Ágar:GM de cássia	3,71 ± 0,19 a	2,09 ± 0,13 a

MS<sub>1</sub>-sais minerais e compostos orgânicos MS (Murashige e Skoog, 1962), sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>), suplementado com 4,44 µM de BA.

MS<sub>2</sub>-sais minerais MS, tiamina (0,1 mg.L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg.L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) e suplementado com 4,44 µM de BA e 0,54 µM de ANA (Stolarz et al., 1991).

Explantes cultivados em meio MS<sub>1</sub> (média de três experimentos independentes ± desvio padrão) e MS<sub>2</sub> (média de dois experimentos independentes ± desvio padrão).

Foram calculadas médias de todos os brotos > 0,5 cm. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes como indicado pelo teste Tukey (p < 0,05).

Nos meios MS<sub>2</sub>, contendo 4,44 µM de BA e 0,54 µM ANA, o número de brotos por explante também foi significativamente mais alto nos meios onde as misturas ágar:GM foram usadas (Tabela 4). Além disso, os brotos tinham aparência saudável com folhas verdes, exibindo poucos fenótipos anormais. Comparativamente, quando somente ágar foi usado como agente geleificante, alguns explantes produziram brotos com folhas morfológicamente anormais. Algumas vezes foi produzido calo compacto branco, ao qual não foi associada a

formação de brotos. Em relação à massa fresca dos explantes não houve diferença significativa entre os meios modificados e o controle. A massa dos explantes foi de aproximadamente 2 g para todos os agentes geleificantes testados (Tabela 4). Quando os explantes foram cultivadas em meio MS sem fitorreguladores (MS<sub>0</sub>), não ocorreu nenhum desenvolvimento de brotos nos meios de cultivo, modificados ou não. Os explantes ficaram amarelos e necróticos após 3 a 4 semanas e, ocasionalmente, alguns deles produziram raízes ou calos.

Stolarz; Macewicz e Lörz (1991) informaram que embriogênese somática direta foi induzida quando meio MS<sub>2</sub> foi usado, e nenhuma formação de calo foi observada em explantes de folha de *Nicotiana tabacum* cultivar Sansun, Wisconsin 38 e Petit havana SR1. Em nosso trabalho, uma combinação desses fitorreguladores induziu só formação de calos e brotos. Essas diferenças nos resultados, podem ser decorrentes dos genótipos de tabaco usados em ambos os experimentos ou de outros fatores dos meios ou condições de cultura.

### 5.2.3.3. Enraizamento

Para o número de raízes e porcentagem de explantes enraizados não houve diferença significativa entre os meios preparados com diferentes agentes geleificantes. Na presença de ágar:GM de guar, o comprimento das raízes foi significativamente maior quando comparado ao meio controle geleificado com ágar ou com a mistura ágar:GM de cássia (Tabela 5).

**TABELA 5 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO ENRAIZAMENTO DE PLÂNTULAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) CULTIVAR AMARELINHO MAUS EM MEIO MS BASAL SEM FITORREGULADORES APÓS 10 DIAS DE CULTIVO.**

Agente Geleificante	Broto enraizados (%)	Número de raízes por explante	Comprimento das raízes por explante (cm)
Ágar	76,63±3,89 a	4,70±1,37 a	3,28±0,16 b
Ágar:GM de guar	82,50±6,82 a	3,90±0,44 a	3,80±0,33 a
Ágar:GM de cássia	77,00±9,06 a	4,03±0,92 a	3,37±0,27 b

Foram calculadas médias de todas as raízes > 1 cm de comprimento (médias de dois experimentos independentes ± desvio padrão). Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes como indicado pelo teste Tukey (p < 0,05).

Após 30 dias de cultivo, os brotos alongaram-se. O comprimento médio das folhas de tabaco foi significativamente maior no meio onde foi utilizada a mistura ágar:GM de guar como agente geleificante. Para o número de folhas não houve diferença significativa entre o meio controle geleificado somente com ágar ou com ágar:GM (Tabela 6).

TABELA 6 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) CULTIVAR AMARELINHO MAUS EM MEIO MS BASAL SEM FITORREGULADORES APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.

Agente Geleificante	Número médio de folhas Por explante	Comprimento médio de folhas por explante (cm)
Ágar	7,75±0,60 a	3,12±0,51 b
Ágar:GM de guar	7,75±0,89 a	3,91±0,58 a
Ágar:GM de cássia	8,59±0,83 a	3,37±0,36 ab

Médias ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes como indicado pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Esses resultados podem estar relacionados com a menor rigidez dos géis obtidos com a mistura de ágar:GM de guar. O fato dessa GM ter massa molecular comparativamente maior que a GM de cássia (Tabela 1, pág. 27), mostra que no sistema o número de moléculas existentes é menor com o uso de GM de guar. Assim, o número de moléculas de água nesse sistema é maior, o que pode favorecer o cultivo *in vitro*.

O importante papel desempenhado pelos agentes geleificantes nos processos morfogênicos (DEBERGH, 1983; RIPETTI; KEVERS e GASPAR, 1994) foi confirmado no presente estudo, onde durante as fases de indução e iniciação, observou-se alteração do número e desenvolvimento de brotos normais, de acordo com o tipo e concentração de agente geleificante utilizado.

Estudos realizados por Scholten e Pierik (1998b) com rosa (*Rosa hybrida* L. cv. Motrea), lírio (*Lilium* cv. Enchantment) e cactus (*Sulcorebutia alba*) mostraram que a composição do ágar pode afetar, em princípio, todos os processos de desenvolvimento. Regeneração de brotos adventícios e raízes são os mais sensíveis. Brown; Leung e Thorpe (1979) observaram efeito inibitório na formação de brotos de tabaco quando certos níveis de ágar foram usados, sendo que uma concentração de 4 g.L<sup>-1</sup> inibiu totalmente o aparecimento de brotos. Segundo o autor, concentrações altas de ágar no meio impediria o estabelecimento de uma pressão de turgor nas células da planta, a qual deve ser estabelecida antes da expansão dessas células. Essa condição de tensão inibiria o crescimento dos calos e formação de brotos. Dhindsa; Beasley e Ting (1975) estudando o crescimento das fibras de algodão (extensão primária) também observaram que a pressão de turgor é essencial para a expansão da célula, e que esta pressão é dependente de um agente osmótico capaz de penetrar o tecido e atravessar a parede da célula.



#### 5.2.4. CONCLUSÕES

Quando foram utilizadas diferentes concentrações de goma guar, melhores resultados de cultivo *in vitro* foram obtidos com o gel na proporção 3:3 g.L<sup>-1</sup> de ágar:GM de guar.

A indução de brotos a partir de explantes de folhas de tabaco utilizando os meios de cultivo MS<sub>1</sub> e MS<sub>2</sub> seguiram a rota da organogênese indireta com formação de calos e brotos mais acentuados, nos meios onde o ágar foi parcialmente substituído por GM;

Na avaliação comparativa dos meios geleificados com ágar e com a mistura ágar:GM não houve diferença significativa em relação à porcentagem de brotos enraizados e número de raízes por explante, porém em relação ao comprimento das raízes e crescimento das plantas o resultado foi melhor no meio modificado. No meio geleificado somente com ágar ocorreu a presença de brotos com fenótipo anormal, o que não foi verificado no meio onde o ágar foi parcialmente substituído por GM;

Com os resultados acima, pode-se sugerir que as GMs podem ter algum papel biológico nesses sistemas.

5.3. USO DE GALACTOMANANA COMO SUBSTITUTA PARCIAL  
DO ÁGAR NA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO  
DE MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* BORKH)

### 5.3.1. INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus x domestica* Bork) é, provavelmente, a espécie frutífera mais cultivada no mundo (DRUART, 2003). É originária do sudeste da Europa e sudoeste da Ásia. Seleções a partir de cultivares selvagens têm sido feitas a milhares de anos (ZIMMERMAN, 1984).

É uma das primeiras plantas lenhosas propagadas com sucesso pelas técnicas *in vitro* e produzidas em escala comercial (GEORGE, 1993), sendo a primeira proliferação de brotos de macieira *in vitro*, seguida de enraizamento obtida por Abbott e Whiteley em 1976. Pesquisas e progressos com a propagação *in vitro* têm provavelmente sido mais extensivos com essa que qualquer outro tipo de árvore e um grande número de artigos sobre esses avanços na propagação *in vitro* de macieira têm sido publicados (ZIMMERMAN, 1984; FIORINO e LORETI, 1987; DUFOUR, 1990; SRISKANDARAJAH; SKIRVIN e ABU-QAoud, 1990; DE KLERK; BRUGGE e MARINOVA, 1997; DRUART, 1997; ZANOL et al., 1998; PEREIRA e FORTES, 2001; ERIG e SCHUG, 2002; RADMANN; FACHINELLO e PETERS, 2002; SCHUCH; ERIG e SILVA, 2003).

O objetivo principal dos programas modernos de cultivo da maçã é produzir frutas com alta qualidade ao menor custo possível. No Brasil, a região sul, principalmente o estado de Santa Catarina destaca-se como o maior produtor de maçãs do país, totalizando 60% da produção nacional (NUNES et al., 1999). O país encontrava-se como o 16º produtor mundial de maçã em 2002 (The World Apple Report, 2004). Em 2003/2004 a produção nacional de maçã está sendo estimada pela Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM) em 1.111.221 toneladas.

Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Bokh) é um porta-enxerto dos mais promissores entre os que foram introduzidos no Brasil. É de origem japonesa, já sendo produzida comercialmente em várias regiões do sul (SCHUCH e PETERS, 1993).

O processo tradicional de produção de mudas de macieira é a enxertia de cultivares comerciais sobre um porta enxerto (DRIESSEN e SOUZA FILHO, 1986), o que é um processo demorado, requerendo áreas relativamente grandes para viveiros, e que pode trazer contaminações para a planta (SCHUCH e PETERS, 1993). A micropropagação apresenta uma contribuição para esta espécie frutífera pois através desta técnica pode-se produzir grande quantidade de porta-enxertos e também cultivares já enraizados, superando, dessa forma, o

problema da incompatibilidade da enxertia e a invasão de doenças durante a propagação (LANE, 1978; DEBERGH, 1988).

Segundo Jones (1993) cerca de 70 porta-enxertos e cultivares de macieira já tinham sido propagados com sucesso por métodos de cultura de brotos axilares (microestacas). Em média, taxas de multiplicação alcançaram 4 a 6, pelo subcultivo regular em intervalos de 30 dias. A cultivar ou porta enxerto *Malus* é considerada uma planta modelo para os estudos de desordens fisiológicas relativas às condições de crescimento *in vitro* tais como a hiperhidricidade (DRUART, 2003).

Em geral, os meios de cultura mais utilizados para a micropropagação de macieira derivam do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), entretanto alguns outros meios como o QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977) tem sido empregados com sucesso para algumas cultivares (DRUART, 1997; DRUART, 2003).

Segundo Sriskandarajah; Mullins e Nair (1982), na fase de multiplicação, é necessário que se tenha um meio rico em citocinina para haver a produção de um grande número de brotações a partir do desenvolvimento de meristemas laterais. Fiorino e Leva (1983), trabalhando com diferentes cultivares de macieira, mostraram que a BA (benziladenina) é a citocinina mais ativa para a multiplicação de brotos, sendo geralmente utilizada com sucesso para muitas variedades e porta-enxertos de macieira em concentrações que variaram de 0,22 a 4,44  $\mu\text{M}$  (LANE, 1978; WERNER e BOE, 1980; PASQUALETTO; ZIMMERMAN e FORDHAM., 1986; PEREIRA e FORTES, 2001; ERIG e SCHUCH, 2002). As citocininas podem ser utilizadas em associação com auxinas e giberelinas para promover o alongamento dos brotos (SCHUCH e PETERS, 1993; SCHUCH; ERIG e SILVA, 2003).

Embora existam espécies que formam raízes adventícias apenas com os níveis endógenos de auxina, geralmente é necessário adicionar auxina exógena para estimular a rizogênese (GRATAPAGLIA e MACHADO, 1998). A quantidade a ser adicionada no meio de cultura depende das concentrações endógenas de auxinas e do explante utilizado, sendo as concentrações mais freqüentes na faixa de 0,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  (BLAKESLEY; WESON e HALL, 1991). Quando a concentração de auxina no meio é excessiva, pode ocorrer a formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento do parte aérea (RADMANN; FACHINELLO e PETERS, 2002).

As auxinas podem ser utilizadas isoladamente (ZANOL et al., 1998; RADMANN; FACHINELLO e PETERS, 2002; DE KLERK; BRUGGE e MARINOVA, 1997) ou em combinação (DRUART, 1997), sendo que o AIB (ácido indolbutírico) é a mais empregada

seguida pelo AIA (ácido 3-indolacético) e ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético) (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

A micropropagação de macieira é normalmente realizada em meios nutritivos semi-sólidos, geleificados com ágar em concentrações que variam de 6 a 8 g.L<sup>-1</sup>, dependendo da origem comercial do polissacarídeo.

Zimmerman; Bhardwaj e Fordham (1995) testaram o uso de misturas de amido de milho e Gelrite® (50: 0,5 g.L<sup>-1</sup>) em comparação com o meio geleificado somente com Bacto ágar Difco (7,5 g.L<sup>-1</sup>) na multiplicação de macieira (*Malus domestica* Borkh) cultivares Empire, Gala, Golden Delicious, Oregon Spur II Delicious, Triple Red Delicious e Royal Gala. A proliferação de brotos foi maior nos meios de cultura geleificados com a mistura amido:Gelrite®.

Ferri et al. (1998) testaram o efeito do ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) e da mistura ágar:amido de mandioca (3:50 g.L<sup>-1</sup>) no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira MM111. Foi observado maior número de raízes por microestaca, maior comprimento das raízes e, antecipação em cerca de 10 dias o aparecimento das raízes, no meio de cultura modificado.

Com o objetivo de testar novos suportes em meio de cultura semi-sólido, que diminuam os custos da cultura *in vitro*, foram realizados estudos do uso das misturas de ágar:galactomanana de guar ou cássia na proporção de 3:3 g.L<sup>-1</sup> em comparação com o uso do ágar à 6 g.L<sup>-1</sup> como agentes geleificantes na micropropagação do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh).

## 5.3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.3.2.1. Material vegetal

Plantas já estabelecidas *in vitro* do porta-enxerto de macieira Marubakaido foram fornecidas pelo Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da EMBRAPA-CPACT, Pelotas, Rio Grande do Sul.

### 5.3.2.2. Fase de multiplicação

Brotações com 40 dias já estabelecidas *in vitro* em meio MS basal (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e suplementado com 2,22  $\mu\text{M}$  de BA foram utilizadas para os testes de multiplicação. O mesmo meio de cultura foi suplementado com concentração de 2,22 ou 4,44  $\mu\text{M}$  de BA e avaliados em combinação fatorial com misturas de ágar:GM guar (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ), ágar:GM de cássia (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ) e ágar (6  $\text{g.L}^{-1}$ ) como agentes geleificantes.

Brotações foram individualizadas e segmentos nodais ( $\pm 1$  cm) com quatro a seis folhas seccionados. Os explantes foram colocados em frascos de cultura (60 mm de diâmetro x 80 mm de altura) contendo 30 mL de meio. Após 40 dias no meio de multiplicação, foram avaliados o número de brotos por explante, o comprimento médio dos brotos e a porcentagem de brotos hiperhídricos (vitrificados), baseado em observações visuais (Figura 15).

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, onde o fitorregulador (BA) foi testado em combinação fatorial com os agentes geleificantes (2x3), sendo utilizados assim seis tratamentos. Cada tratamento foi constituído por 10 unidades experimentais, cada unidade experimental sendo um frasco com 6 segmentos de planta, totalizando 60 segmentos por tratamento. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

### 5.3.2.3. Fase de enraizamento

Explantes mantidos 40 dias no meio de multiplicação foram individualizados em segmentos apicais com  $\pm 1,5$  cm, sendo então transferidos para frascos contendo 30 mL de meio com sais diluídos a metade ( $\frac{1}{2}\text{MS}$ ) e compostos orgânicos do MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de mio-inositol, 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, sem fitorregulador ou suplementado com 0,49 ou 4,90  $\mu\text{M}$  de AIB, em combinação fatorial com

misturas de ágar:GM de guar (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ágar:GM de cássia (3:3 g.L<sup>-1</sup>) e ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) utilizados como agentes geleificantes (Figura 15).

Para avaliar a eficiência dos meios de enraizamento, a porcentagem de brotos enraizados, o número médio de raízes por broto, o comprimento médio das raízes e a presença de calos na base dos brotos, foi registrado depois de 30 dias. Para esta última variável, uma escala de avaliação de 0 a 3 foi usada, sendo 0 = ausência de calo, 1 = calo pequeno, 2 = calo intermediário e 3 = calo grande.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, onde o fitorregulador (AIB) foi testado em combinação fatorial com os agentes geleificantes (3x3), sendo utilizados assim nove tratamentos. Cada tratamento foi constituído de oito unidades experimentais contendo 6 brotações cada, totalizando 48 segmentos por tratamento. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

#### **5.3.2.4. Condições de cultura**

Para os ensaios de multiplicação e enraizamento, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura controlada de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  com luz fluorescente do tipo branca fria, intensidade de fluxo de fótons de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da UFPR.

#### **5.3.2.5. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa MSTATC (Michigan State University), versão 2.11. A homogeneidade das médias foi testada por análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

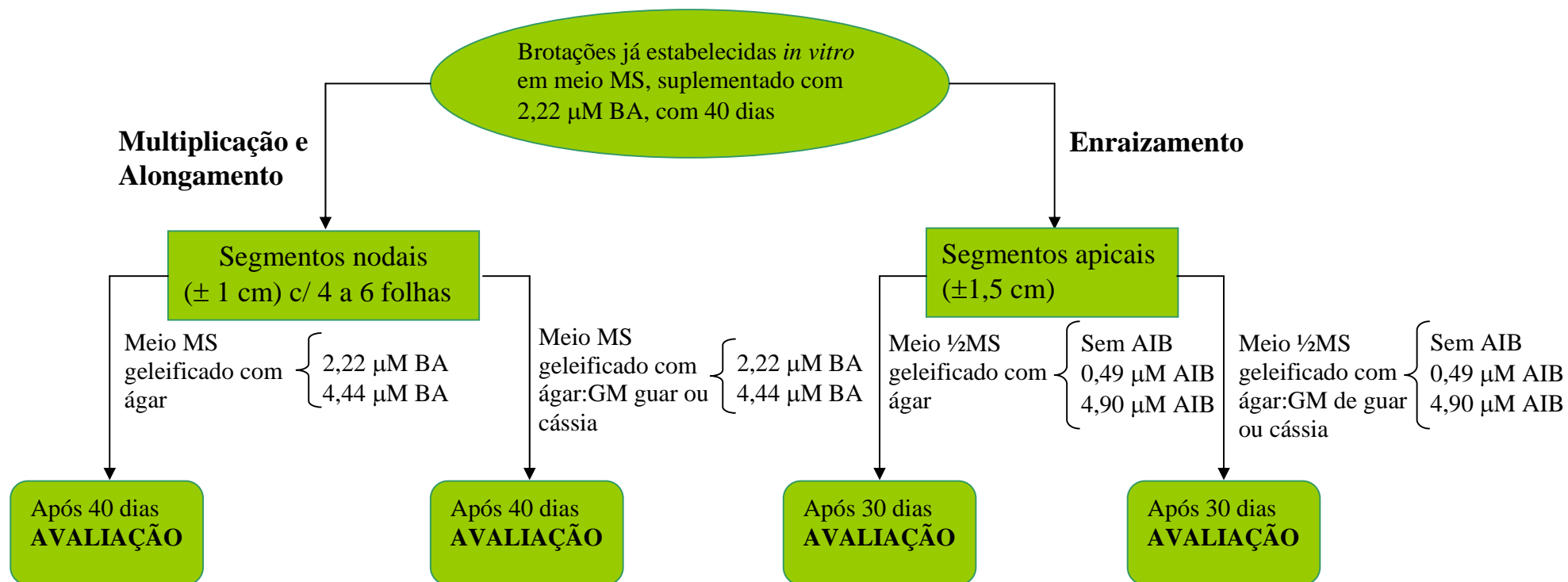


FIGURA 15 - FLUXOGRAMA BÁSICO DA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* Borkh)



### 5.3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.3.1. Multiplicação

O número e o comprimento dos brotos foram significativamente afetados pelo agente geleificante ( $P = 0,0143$  e  $P = 0,0000$ , respectivamente) mas não pela interação entre o agente geleificante e a concentração de BA ( $P = 0,7290$  e  $P = 0,1243$ , respectivamente). Na presença de 2,22 ou 4,44  $\mu\text{M}$  de BA, os brotos apresentaram resposta similar para o mesmo agente geleificante. O número de brotos foi maior no meio geleificado com a mistura ágar:GM de guar quando comparado ao controle geleificado somente com ágar, mas não foi observada diferença significativa (Tabela 7, Figura 16). O comprimento de brotos foi maior no meio controle com ágar, mas não foi observada diferença significativa em relação a mistura ágar:GM de guar. No meio geleificado com ágar:GM de cássia o número e comprimento dos brotos mostrou diferença significativamente menor em relação ao controle e à mistura ágar:GM de guar.

TABELA 7 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO NÚMERO MÉDIO DE BROTO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* Borkh) EM MEIO MS APÓS 40 DIAS DE CULTIVO PARA AS CONCENTRAÇÕES DE 2,22 E 4,44  $\mu\text{M}$  DE BA.

Agente geleificante	Número médio de brotos/ explante	Comprimento médio de brotos (cm)
Ágar	7,16±1,24 ab	1,85±0,25 a
Ágar:GM de guar	7,60±1,45 a	1,81±0,21 a
Ágar:GM de cássia	6,19±1,76 b	1,17±0,25 b

Médias de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes como indicado pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Ocorreu interação significativa entre os agentes geleificantes e a concentração de BA ( $P = 0,0000$ ) para a porcentagem de brotos hiperhídricos. Para as duas concentrações de BA, uma significativa redução na porcentagem de brotos hiperhídricos foi observada no meio geleificado com a mistura ágar:GM sendo que, no meio geleificado com a mistura ágar:GM de cássia e 4,44  $\mu\text{M}$  de BA, nenhum sintoma de hiperhidricidade foi observado (Tabela 8).



FIGURA 16 – PROLIFERAÇÃO DE BROTO DE PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM 4,44  $\mu\text{M}$  BA E GELEIFICADO COM: (a) ÁGAR (6  $\text{g.L}^{-1}$ ); (b) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ); (c) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ) APÓS 40 DIAS DE CULTIVO (BARRA: 10mm).

TABELA 8 - EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE O AGENTE GELEIFICANTE E A CONCENTRAÇÃO DE BA NA PORCENTAGEM DE BROTO HIPERHÍDRICOS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* Borkh) EM MEIO MS APÓS 40 DIAS DE CULTIVO.

Agente geleificante		Concentração de BA ( $\mu\text{M}$ )	
		2,22	4,44
Broto hiperhídrico (%)	Ágar	19,35 $\pm$ 1,90 a	30,85 $\pm$ 1,2 a
	Ágar:GM de guar	6,65 $\pm$ 2,24 b	7,55 $\pm$ 1,4 b
	Ágar:GM de cássia	2,50 $\pm$ 0,88 c	0,00

Médias de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma concentração de fitorregulador não são significativamente diferentes como indicado pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O número de brotos e comprimento médio de brotos que se desenvolveram no meio geleificado somente com ágar, estão de acordo com os valores reportados por Pereira e Fortes (2001) para o Marubakaido. Nunes et al. (1999) encontraram para o mesmo porta-enxerto, médias inferiores às obtidas no presente trabalho. Os autores obtiveram número médio de brotos de 4,73 e 1,73 e comprimento médio de brotos de 1,66 e 0,81 cm, no meio suplementado com 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$  de BA, respectivamente. Erig e Schuch (2002) utilizando 4,44  $\mu\text{M}$  de BA, obtiveram para o mesmo porta-enxerto, 3,78 brotos/explantes e comprimento de brotos de 0,96 cm. Resultados estes, também inferiores ao presente trabalho. Segundo

Zimmerman (1984) nem sempre uma mesma cultivar responde da mesma forma a condições similares em diferentes laboratórios.

Os resultados encontrados nos meios geleificados com as misturas ágar:galactomanana, para as variáveis número médio de brotos e comprimento médio de brotos (Tabela 7, pág. 70), são menores que os valores obtidos por Lima-Nishimura et al. (2003) que fizeram a substituição parcial do ágar por xiloglucana extraída de sementes de *Hymenaea courbaril*, na micropropagação do mesmo porta-enxerto de macieira (11,7 e 3,6 cm para o número médio de brotos e comprimento médio dos brotos, respectivamente). Para porcentagem de brotos hiperhídricos os resultados do presente trabalho mostram-se superiores (Tabela 8), já que os autores obtiveram maior porcentagem de brotos hiperhídricos (cerca de 10% dos brotos) no meio geleificado com a mistura ágar:xiloglucana (4:2 g.L<sup>-1</sup>).

Pasqualeto; Zimmerman e Fordham (1986) em estudos com macieira cultivar Gala verificaram decréscimo significativo na porcentagem de plantas hiperhídricas com o aumento da concentração de ágar no meio. Entretanto, a elevação na concentração do ágar pode resultar em um meio muito consistente que, embora útil para evitar a hiperhidricidade, provoca inibição no desenvolvimento da planta, reduzindo a taxa de multiplicação, devido à diminuição da disponibilidade de citocinina para os explantes.

Singha (1982, 1984), testando o uso de diferentes tipos de ágar em diferentes concentrações, na multiplicação de macieira (*Malus baccata* L. Borkh.) cv. Almey, obteve 28,1 e 4,0 brotos no meio de cultura utilizando como agente geleificante o ágar em concentrações de 3 e 6 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

### 5.3.3.2. Enraizamento

As raízes começaram a ser visíveis nove dias após transferência para os meios de enraizamento, modificado ou não pela presença de galactomananas. Em geral, durante a fase de enraizamento, nos meios acrescidos de AIB não houve diferença significativa na porcentagem de brotos enraizados (Tabela 9).

Todas as variáveis do enraizamento foram significativamente afetadas pela interação agente geleificante e concentração de AIB com  $P = 0,0000$  para número, comprimento de raízes e presença de calo e  $P = 0,0045$  para porcentagem de brotos enraizados.

Os resultados da Tabela 9 indicaram que a porcentagem máxima de enraizamento (100%) foi obtida no meio ½MS suplementado com 0,49 µM de AIB e geleificado com as

misturas de ágar e GM de guar ou cássia, porém sem diferença significativa com o meio controle com ágar.

Nos meios onde não foi utilizado fitorregulador, o número médio de raízes não apresentou diferença significativa para todos os agentes geleificantes. O comprimento médio das raízes foi maior no meio onde a mistura ágar:GM de guar foi usada como agente geleificante, em relação ao meio geleificado com ágar e ágar:GM de cássia. A presença de calos não foi observada. Nestes meios, modificados ou não, em geral, não foi observada a presença de raízes secundárias (Tabela 9, Figura 17a, b, c).

**TABELA 9 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO ENRAIZAMENTO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* Borkh) EM MEIO ½MS SUPLEMENTADO OU NÃO COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE AIB APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.**

Agente Geleificante		Concentração de AIB (µM)		
		0	0,49	4,90
Brotos enraizados (%)	Ágar	89,50±5,86 abA	93,63±8,00 aA	94,69±4,40 aA
	Ágar:GM de guar	93,75±7,33 aA	100,00±0,00 aA	95,75±6,43 aA
	Ágar:GM de cássia	82,25±12,2 bB	100,00±0,00 aA	100,00±0,00 aA
Número de raízes Por broto	Ágar	3,13±0,46 aC	4,29±0,57 cB	10,32±0,86 cA
	Ágar:GM de guar	2,88±0,44 aC	7,00±0,94 aB	16,67±1,08 aA
	Ágar:GM de cássia	3,08±0,49 aC	5,48±0,80 bB	13,22±1,10 bA
Comprimento de raízes (cm)	Ágar	4,86±0,46 bA	4,27±0,34 aB	2,14±0,27 abC
	Ágar:GM de guar	5,91±0,64 aA	2,75±0,49 bB	1,94±0,22 bC
	Ágar:GM de cássia	4,70±0,48 bA	2,81±0,39 bB	2,60±0,26 aB
Tamanho de calos*	Ágar	0,0	0,0	1,72±0,37 aA
	Ágar:GM de guar	0,0	0,98±0,06 aB	1,97±0,30 aA
	Ágar:GM de cássia	0,0	0,0	1,84±0,27 aA

\*Tamanho de Calos : escala de 0 a 3 foi usada, onde 0 = ausência de calo, 1 = calo pequeno, 2 = calo intermediário e 3 = calo grande.

Média de dois independentes experimentos ± desvio padrão). Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha (para cada uma das variáveis) não são significativamente diferentes como indicado pelo teste de Tukey (p < 0,05).

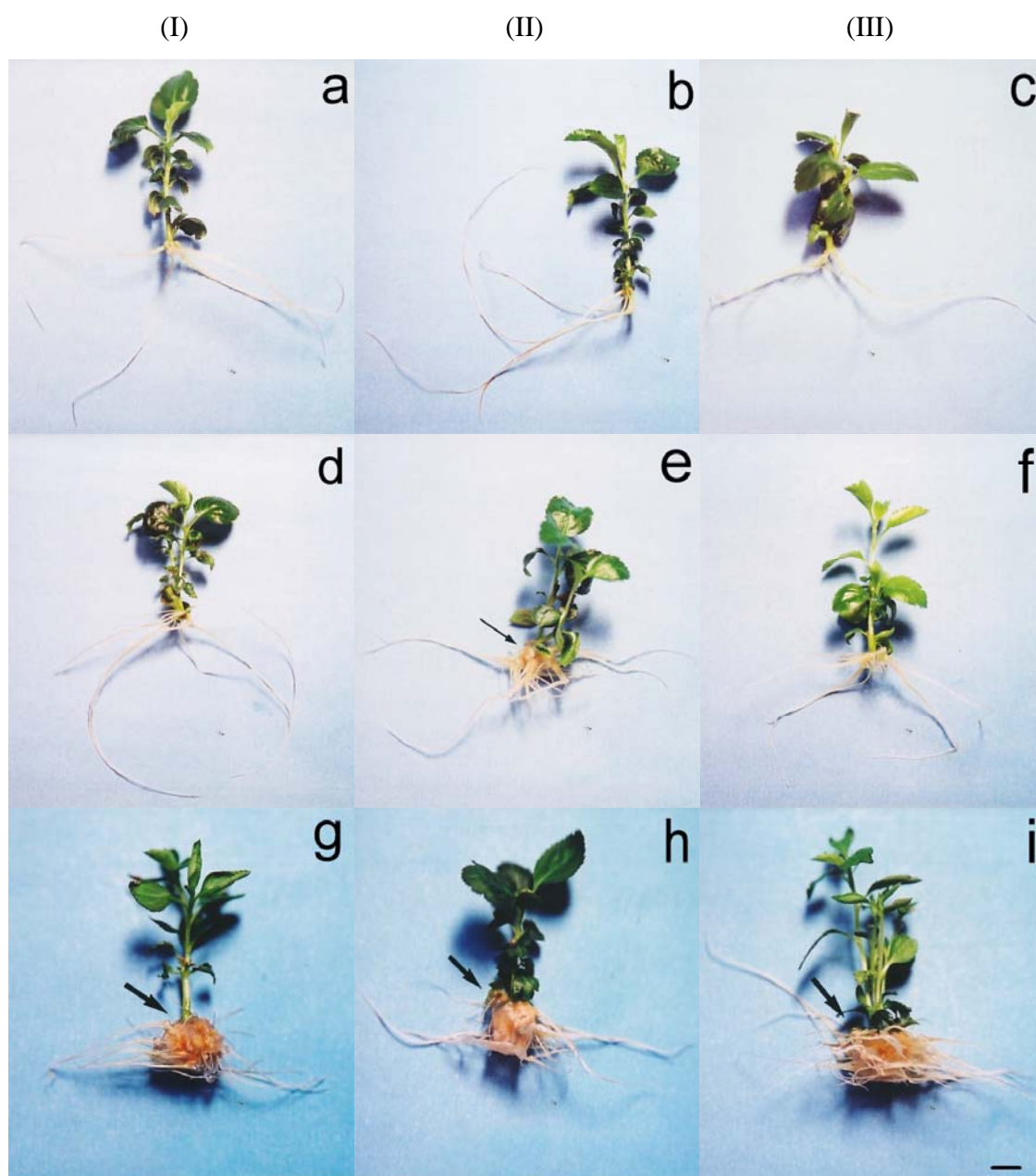


FIGURA 17 - ENRAIZAMENTO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* Borkh) EM MEIO  $\frac{1}{2}$ MS SEM AUXINA (a, b, c); SUPLEMENTADO COM  $0,49 \mu\text{M}$  DE AIB (d, e, f); SUPLEMENTADO COM  $4,90 \mu\text{M}$  DE AIB (g, h, i) GELEIFICADO COM: (I) ÁGAR ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ); (II) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR ( $3:3 \text{ g.L}^{-1}$ ); (III) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA ( $3:3 \text{ g.L}^{-1}$ ) APÓS 30 DIAS DE CULTIVO. SETAS: MOSTRAM A PRESENÇA DE CALOS (BARRA: 10mm)

Nos meios com  $0,49 \mu\text{M}$  de AIB, o número de raízes foi maior nos brotos cultivados no meio ágar:GM de guar e ágar:GM de cássia com diferença significativa comparada ao meio geleificado somente com ágar. O comprimento de raízes foi significativamente superior no meio com ágar, em relação aos meios modificados pela

presença de galactomanana. A presença de pequenos calos friáveis foi observada somente no meio onde a mistura ágar:GM de guar foi utilizada (Tabela 9, Figura 17d, e, f).

Uma concentração mais elevada de AIB (4,90  $\mu\text{M}$ ), induziu um aumento no número de raízes em todos os meios. Os meios com ágar:GM de guar e ágar:GM de cássia apresentaram valores mais altos para essa variável com diferença significativa quando comparado ao meio geleificado com ágar. O comprimento de raízes foi maior no meio geleificado com a mistura ágar:GM de cássia, mas não houve diferença significativa em relação ao meio controle com ágar somente. A presença de calos foi observada em todos os meios de cultivo (Tabela 9, Figura 17g, h, i).

Segundo Zimmerman (1984), a concentração de 4,90 $\mu\text{M}$  de AIB induziu a formação de calos em muitos cultivares e concentrações superiores, além de estimular a produção de calos, podem inibir o enraizamento. Entretanto, a presença destes calos não prejudicou o enraizamento da Marubakaido em meios modificados, já que não inibiu a formação e crescimento das raízes.

Uma grande quantidade de raízes laterais foi formada nos meios de cultura contendo 4,90 $\mu\text{M}$  de AIB e modificados pela presença de GM de guar ou de cássia. No primeiro meio, essas raízes eram longas e no segundo, pequenas. No meio controle com ágar, uma pequena quantidade de raízes secundárias foi observada (Figura 17g, h, i).

Para o meio geleificado somente com ágar, porcentagens de enraizamento semelhantes para o mesmo porta-enxerto foram encontradas por Zanol et al. (1997) que obtiveram cerca de 95% de enraizamento no meio  $\frac{1}{2}\text{MS}$  sem fitorreguladores.

Nunes et al. (1999), utilizando macro e micro-nutrientes do meio MS reduzidos a 1/3, encontraram para Marubakaido, menor porcentagem de enraizamento (73%), quando 4,90 $\mu\text{M}$  de AIB foi utilizado. Resultado inferior ao do presente trabalho (94,69%).

O resultado encontrado para o número de raízes por broto (em torno de 3 raízes por broto) nos meios de cultura sem fitorreguladores e geleificado com as misturas de ágar:GM (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ) é semelhante ao obtido por Lima-Nishimura et al. (2003) utilizando a mistura ágar:xiloglucana (4:2  $\text{g.L}^{-1}$ ), para o mesmo porta enxerto de macieira. Entretanto os autores obtiveram menores médias para o comprimento das raízes e a porcentagem de brotos enraizados (2,0 cm e 70,8%, respectivamente).

Ferri et al. (1998) testando a combinação de ágar (3  $\text{g.L}^{-1}$ ) com amido de mandioca (50  $\text{g.L}^{-1}$ ) associado à diferentes concentrações de AIB também obtiveram resultados positivos no

enraizamento *in vitro* do porta enxerto de macieira MM 111, com importante formação de calos, os quais não interferiram durante a etapa de enraizamento.

Leite (1995) testou ágar e vermiculita como substrato para o enraizamento de pereira (*Pyrus communis* L.) e verificou que somente na vermiculita os explantes originaram sistema radicial ramificado. Resultados semelhantes foram observados por Lopes et al. (2001) que não observaram a formação de raízes secundárias ou pêlos absorventes no enraizamento de mogno (*Swetenia macrophylla* King) em meios geleificados com ágar. As raízes assim formadas no meio semi-sólido geleificado com ágar podem ser pouco eficientes na absorção de água e nutrientes (HOFFMANN et al., 2001), o que causa uma baixa taxa de sobrevivência durante a aclimatização (ZIMMERMAN, 1981).

#### 5.3.4. CONCLUSÕES

Não houve diferença significativa em relação a proliferação de brotos para a cultivar de macieira quando comparados os meios contendo ágar:GM (3:3 g.L<sup>-1</sup>) e somente ágar (6 g.L<sup>-1</sup>), porém, foi observado uma redução nos sintomas de hiperhidricidade quando a mistura foi utilizada;

Na ausência de fitorreguladores as porcentagens de brotos enraizados de 93 e 82 %, respectivamente, para os meios contendo as misturas ágar:GM de guar ou de cássia (3:3 g.L<sup>-1</sup>) foram semelhantes ao valor obtido no meio contendo somente ágar (90 %);

A formação de calos não foi observada nos meios sem fitorreguladores, independente da presença ou não de galactomanana. Os experimentos com adição de fitorreguladores demonstraram a formação de calos no meio normal ou modificado e, quanto maior a concentração de AIB, maior o tamanho desses calos.



5.4. USO DE GALACTOMANANA COMO SUBSTITUTA PARCIAL  
DO ÁGAR NA MICROPROPAGAÇÃO DE PEREIRA  
(*Pyrus communis* L.) CV. DURONDEAU

### 5.4.1. INTRODUÇÃO

A pereira (*Pyrus communis* L.) é uma árvore pertencente à família *Rosaceae*, originária da região do mediterrâneo, principalmente da Grécia. Seu cultivo é difundido em todos os continentes (Europa, América do Norte e Sul, Ásia, África e Oceania). Deriva da seleção de espécies silvestres (*Pyrus communis* var. *pyraster*) híbrida com outras variedades européias e asiáticas: *Pyrus nivalis* Jacq., *P. pyrifolia* (Burn. F.), *P. spinosa* Forssk., etc.

A (*Pyrus communis* L.) cultivar Durondeau é uma espécie originária da Bélgica e muito difundida em seu país de origem.

É uma fruta de clima temperado de grande importância nacional, tendo em vista seu alto consumo, sendo a terceira mais consumida no Brasil depois da maçã e do pêssego (NAKASU e LEITE, 1990). Entretanto, a produção brasileira desta fruta é bem pouco expressiva, o que impõe ao país a condição de segundo maior importador, com cerca de 162 mil toneladas, em 1997 (JOÃO et al., 2002). O plantio de cultivares de baixa qualidade tem favorecido as importações de pêra fresca, principalmente do Chile e Argentina. Por essa razão existe a necessidade do país produzir frutas de qualidade semelhante às importadas (COUTINHO et al., 2003). A área cultivada com pêras européias no Brasil é extremamente pequena, estimando-se haver 500 ha nas regiões tradicionais de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e 150 ha recentemente implantados no sul do Rio Grande do Sul (OSORIO e FORTES, 2003).

A falta de adaptação do material genético e o abortamento de gemas são os principais problemas para o desenvolvimento da cultura. Em decorrência, outros são pouco estudados, como: compatibilidade com polinizadores/cultivares, porta-enxertos adaptados às condições de solo e clima, pragas e doenças (OSORIO e FORTES, 2003). Sua propagação normalmente se realiza através de enxertia.

A micropropagação de muitas cultivares de pereira (*Pyrus communis* L.) tem sido realizada em meio de cultura modificado do meio MS (SINGHA; OBERLY e TOWSEND, 1987; MELLO-FARIAS; PETERS e NAKASU, 1996; DOLCET-SANJUAN; MOK e MOK, 1990; SHIBLI et al., 1997; ERIG; SCHUCH e BRAGA, 2004). O meio QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977), Cheng (CHENG, 1978) e WPM (McCOWN e LLOYD, 1981) também tem sido utilizados na micropropagação de algumas cultivares (DRUART, 1987; LEBLAY; CHEVREAU e RABOIN, 1991; YEO e REED, 1995; DRUART, 2003).

Durante a fase de multiplicação de muitas cultivares de pereira o meio de cultura é suplementado com BA em concentrações que variam de 4,44 a 8,88  $\mu\text{M}$  (SINGHA, 1982; SINGHA, 1984; SINGHA; TOWNSEND e OBERLY, 1985). Para algumas cultivares, a citocinina é utilizada em combinação com  $\text{GA}_3$  e ANA (VISEUR, 1987; LEITE; PETERS e NAKUSA, 1993; ERIG; SCHUCH e BRAGA, 2004).

O enraizamento *in vitro* de pereira geralmente é realizado em meio de cultura com concentração reduzida de sais (GEORGE, 1993) suplementado com concentrações de AIB que variam de acordo com a cultivar (DOLCET-SANJUAN; MOK e MOK, 1990; MELLO-FARIAS; PETERS e NAKASU, 1996; SHIBLI et al., 1997).

Com o objetivo de melhorar o processo e diminuir os custos da cultura de tecidos vegetais *in vitro*, foi testado o uso de misturas de ágar:galactomanana de guar ou cássia na proporção de 3:3  $\text{g.L}^{-1}$  em comparação com o uso do ágar à 6  $\text{g.L}^{-1}$  como agentes geleificantes em diferentes meios de cultura na multiplicação e enraizamento de pereira (*Pyrus communis* L.) cultivar Durondeau.

## 5.4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.4.2.1. Material vegetal

Plantas já estabelecidas *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Durondeau foram fornecidas pelo Dr. P. Druart (Centre de Recherches Agonomiques – Département de Biotechnologie, Gembloux-Bélgica).

### 5.4.2.2. Fase de multiplicação

Brotações com 40 dias já estabelecidas *in vitro* em meio basal consistindo de sais do meio QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977), 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina HCl, 1 mg.L<sup>-1</sup> de riboflavina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e suplementado com 4,44 µM de BA e 0,29 µM de GA<sub>3</sub> foram utilizadas para os testes de multiplicação. O mesmo meio de manutenção geleificado com misturas de ágar:GM de guar (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ágar:GM de cássia (3:3 g.L<sup>-1</sup>) ou ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) foram testados.

Brotações foram individualizadas e segmentos nodais ( $\pm 1$  cm) com quatro a seis folhas seccionados. Os explantes foram colocados em frascos de cultura (60 mm de diâmetro x 80 mm de altura) contendo 30 mL de meio. Após 40 dias no meio de multiplicação, foram avaliados o número de brotos por explante, o comprimento médio dos brotos e a porcentagem de brotos hiperhídricos (vitrificados), baseado em observações visuais (Figura 18).

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando-se três tratamentos. Cada tratamento foi constituído por 10 unidades experimentais, cada unidade experimental sendo um frasco com 6 segmentos de planta, totalizando 60 segmentos por tratamento. Os experimentos foram repetidos cinco vezes.

### 5.4.2.3. Fase de enraizamento

Explantes mantidos 40 dias no meio de multiplicação foram individualizados em segmentos apicais com  $\pm 1,5$  cm, sendo então transferidos para frascos contendo 30 mL de meio basal.

Para o enraizamento da pereira foram utilizados dois meios basais. O primeiro meio de enraizamento consiste em ½ macro-nutrientes de QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977) e micro-nutrientes de QL, 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina HCl, 1mg.L<sup>-1</sup> de riboflavina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de

mio-inositol, 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (DRUART, 1987), sem fitorreguladores, ou suplementado com 0,98 ou 9,80 µM de AIB em combinação fatorial com sistemas geleificantes de ágar:GM de guar (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ágar:GM de cássia (3:3 g.L<sup>-1</sup>) ou ágar (6 g.L<sup>-1</sup>).

O segundo meio utilizado foi com sais diluídos pela metade (½ MS) e compostos orgânicos do MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose, sem fitorreguladores ou suplementado com 0,49 ou 2,46 µM AIB. Os meios foram geleificados com misturas de ágar:GM de guar (3:3 g.L<sup>-1</sup>), ágar:GM de cássia (3:3 g.L<sup>-1</sup>) e ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) (Figura 18).

Os meios de cultivo foram preparados como citado em 4.1.4., pág. 24. Para o enraizamento no meio basal ½QL, o pH foi ajustado para 5,5.

Para avaliar a eficiência dos meios de enraizamento, determinou-se a porcentagem de brotos enraizados, o número médio de raízes por broto, o comprimento médio das raízes e a presença de calos na base dos brotos, classificados segundo o seu tamanho (registrado após 30 dias). Para esta última variável uma escala de avaliação de 0 a 3 foi usada, sendo 0 = nenhum calo observado (ausência), 1 = pequenos calos, 2 = calos intermediários e 3 = grandes calos.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, onde o fitorregulador (AIB) foi testado em combinação fatorial com os agentes geleificantes (3x3), sendo assim utilizados nove tratamentos para cada um dos meios basais testados (½QL e ½MS). Cada tratamento continha sete unidades experimentais contendo 6 brotações cada, totalizando 42 segmentos por tratamento. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

#### **5.4.2.4. Condições de cultura**

Para os ensaios de multiplicação e enraizamento, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura controlada de 25 ± 2°C com luz fluorescente do tipo branca fria, intensidade de fluxo de fótons de 40 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da UFPR.

#### **5.4.2.5. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa MSTATC (Michigan State University), versão 2.11. A homogeneidade das médias foi testada por análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

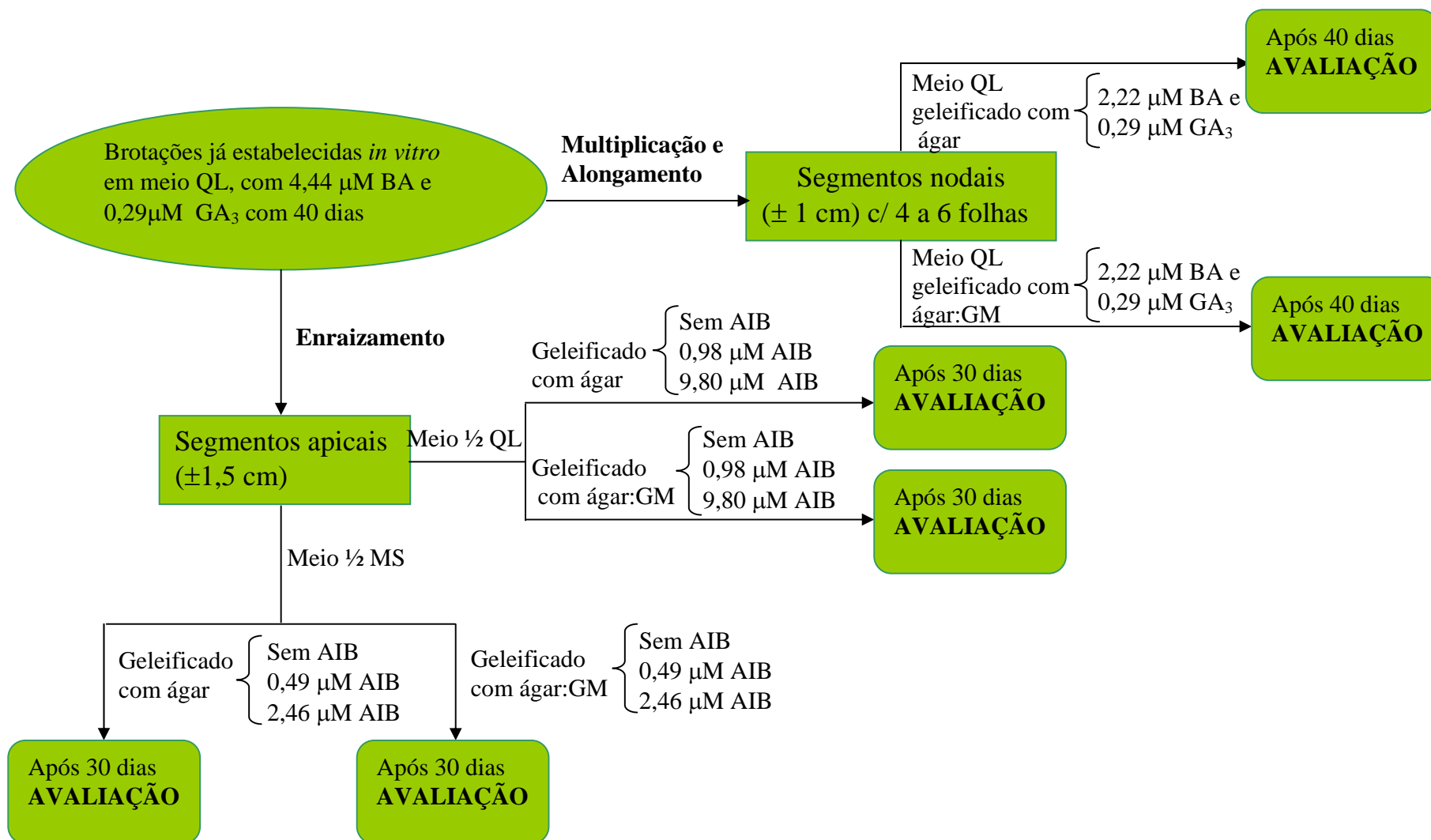


FIGURA 18 - FLUXOGRAMA BÁSICO DA MICROPROPAGAÇÃO DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURENDEAU

### 5.4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.4.3.1. Multiplicação

A proliferação de brotos foi significativamente maior nos meios onde as misturas ágar:GM de guar e ágar:GM de cássia foram usadas, em comparação com o meio controle geleificado somente com ágar. Um aumento no comprimento dos brotos foi observado no meio geleificado com a mistura ágar:GM de guar, com diferença significativa em relação ao meio controle geleificado com ágar somente, e com ágar:GM de cássia. Os resultados mostraram que na mistura ágar:GM de cássia ocorreu redução na porcentagem de brotos hiperhídricos, mas essa redução não foi estatisticamente diferente em relação ao meio geleificado com ágar somente. A presença de brotos hiperhídricos foi maior no meio geleificado com a mistura de ágar:GM de guar, com diferença significativa em relação ao meio controle (Tabela 10, Figura 19).

Viseur (1987) utilizando meio de cultura suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  de BA, 0,29  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub> e 0,054  $\mu\text{M}$  de ANA, geleificado com ágar (5 g.L<sup>-1</sup>) obteve 2,80 brotos por explante, após 21 dias de cultura, para a cultivar Durondeau, sendo esse resultado inferior ao encontrado no presente trabalho.

Zimmerman; Bhardwaj e Fordham (1995) usaram a mistura de amido e Gelrite® (50:0,5 g.L<sup>-1</sup>) na propagação das cultivares Seckel e Beurre d'Anjou. Segundo os autores, a proliferação de brotos foi reduzida 11 e 83%, respectivamente, devido a hiperhidricidade em presença desses dois agentes geleificantes. O fenômeno que foi amenizado quando um agente controlador da hiperhidricidade comercial foi acrescentado aos meios de cultivo.

TABELA 10 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NA MULTIPLICAÇÃO DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO QL SUPLEMENTADO COM 4,44  $\mu\text{M}$  BA E 0,29  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> APÓS 40 DIAS DE CULTIVO.

Agente geleificante	Número médio de brotos/explante	Comprimento médio de brotos (cm)	Brotos hiperhídricos (%)
Ágar	6,11±1,10 c	1,06±0,11 b	3,70±1,81 b
Ágar:GM de guar	8,95±1,02 a	1,30±0,08 a	6,88±1,93 a
Ágar:GM de cássia	7,30±0,87 b	1,16±0,10 b	3,48±2,28 b

Média de cinco experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra no mesmo parâmetro não são significativamente diferentes como indicado pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



FIGURA 19 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NA MULTIPLICAÇÃO DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO QL SUPLEMENTADO COM 4,44  $\mu\text{M}$  BA E 0,29  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> GELEIFICADO COM: (a) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>); (b) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR (3:3 g.L<sup>-1</sup>); (c) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) APÓS 40 DIAS DE CULTIVO. (BARRA: 10mm)

Leite; Peters e Nakusa (1993) testaram o uso de ágar e gelrite em diferentes concentrações na multiplicação de pereira (*Pyrus* spp.) cv. Carrick. Menor número de gemas por explante foram obtidas (cerca de 3 gemas por explante) quando Gelrite® foi utilizado como agente geleificante, o qual induziu hiperhidricidade de forma generalizada em todas as concentrações utilizadas.

#### 5.4.3.2. Enraizamento

O enraizamento de pereira nos meios ½QL e ½MS foi avaliado como experimentos independentes. Nos dois meios, modificados ou não pela presença de GM, as raízes se formaram cinco dias após os brotos serem transferidos para os meios de enraizamento.

O enraizamento no meio ½QL foi significativamente afetado pela interação entre o agente geleificante e a concentração de AIB ( $P = 0,0000$ ). Após 10 dias nesse meio basal suplementado com AIB, aproximadamente 20% dos explantes apresentaram raízes quando a mistura ágar:GM foi usada como agente geleificante, mas somente 5% de brotos estavam enraizados no meio onde somente ágar foi utilizado.

Os resultados da Tabela 11 indicaram que a maior porcentagem de enraizamento (91.17%) foi obtida no meio ½QL em presença de 9,80  $\mu\text{M}$  de AIB e geleificado com a mistura ágar:GM de cássia.



TABLE 11 - EFEITO DOS AGENTES GELEIFICANTES NO ENRAIZAMENTO DE BROTOS DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO ½QL SUPLEMENTADO OU NÃO COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE AIB APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.

Agente Geleificante		Concentração de AIB (μM)		
		0	0,98	9,80
Brotos enraizados (%)	Ágar	28,71±2,50 bC	38,63±5,45 cB	49,27±6,87 cA
	Ágar:GM de guar	44,00±5,23 aB	66,64±6,85 aA	66,90±7,47 bA
	Ágar:GM de cássia	34,71±3,08 bC	50,84±6,22 bB	91,17±10,0 aA
Número de raízes por broto	Ágar	1,13±0,59 aB	1,54±0,47 aAB	1,98± 0,50 bA
	Ágar:GM de guar	1,50±0,46 aB	2,06±0,49 aB	4,29± 0,74 aA
	Ágar:GM de cassia	1,57±0,59 aB	2,10±0,43 aB	4,27± 0,56 aA
Comprimento de raízes (cm)	Ágar	1,13±0,16 bB	1,76±0,08 bA	1,21± 0,25 bB
	Ágar:GM de guar	1,88±0,22 aA	1,46±0,15 cB	1,44± 0,10 aB
	Ágar:GM de cássia	1,26±0,18 bC	2,09±0,09 aA	1,54± 0,20 aB
Tamanho de calos*	Ágar	0,0	0,0	1,13± 0,09 bA
	Ágar:GM de guar	0,0	0,0	1,81± 0,09 aA
	Ágar:GM de cássia	0,0	0,0	0,80± 0,09 cA

\*Tamanho de Calos : escala de 0 a 3 foi usada, onde 0 = ausência de calo, 1 = calo pequeno, 2 = calo intermediário e 3 = calo grande.

Média de dois experimentos independentes ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha (para cada uma das variáveis) não são significativamente diferentes como indicado pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As misturas de ágar e GM, nos meios sem AIB ou suplementado com 0,98 ou 9,80μM de AIB mostraram valores mais altos para as variáveis porcentagem de brotos enraizados, número e comprimento de raízes, comparado com os meios solidificados somente com ágar, exceto para a variável comprimento de raízes em presença de 0,98 μM de AIB e geleificado somente com ágar, que apresentou maior média que a mistura ágar:GM de guar (Tabela 11).

A formação de calos foi verificada somente com uma alta concentração de AIB (9,80 μM), em todos os meios de cultura, com ou sem a substituição parcial do ágar por GM, sendo que no meio onde a mistura ágar:GM de cássia foi utilizada o tamanho desses calos foi significativamente menor em relação aos meios geleificados com a mistura ágar:GM de guar e somente ágar (Tabela 11, Figura 20).

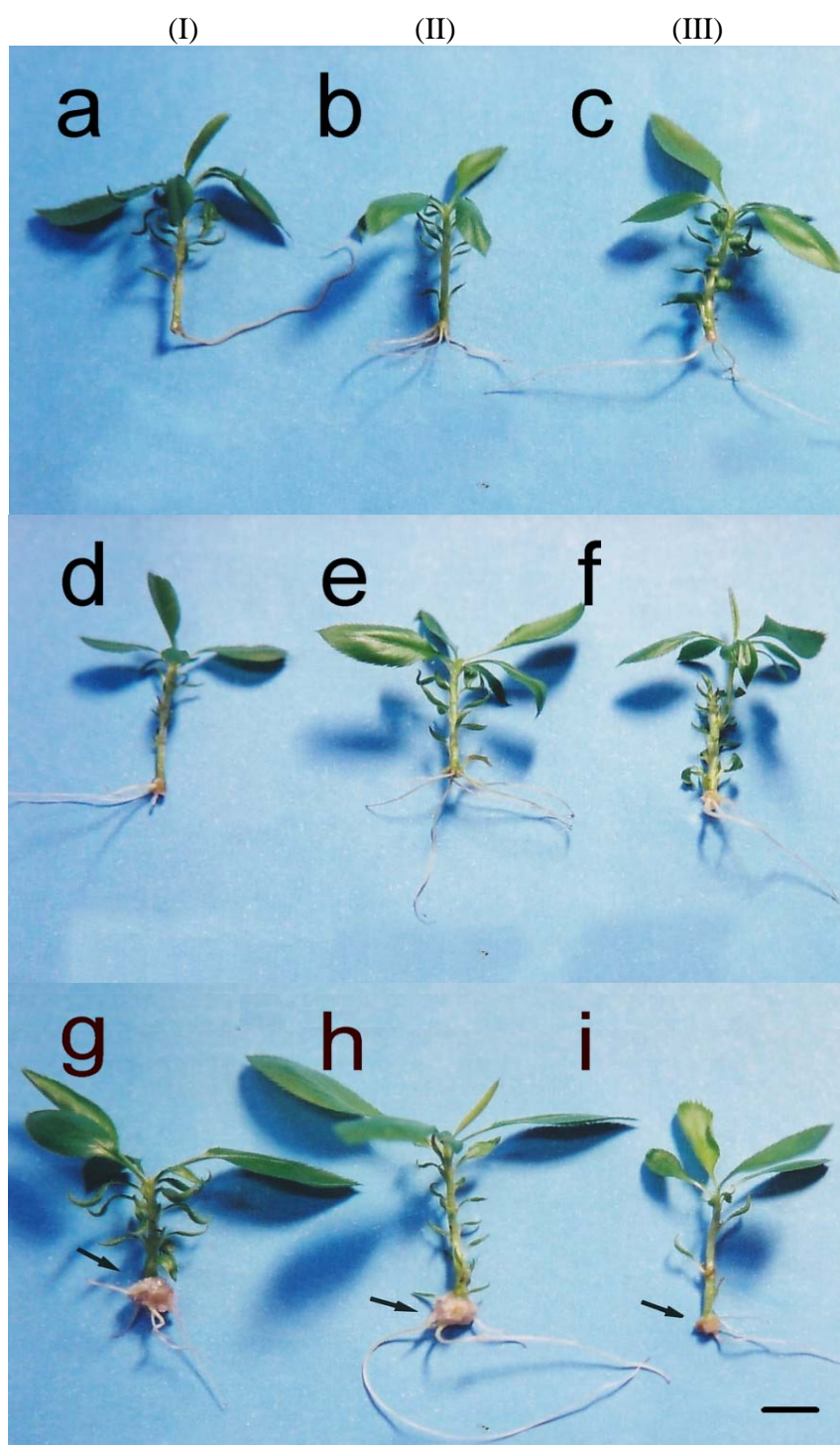


FIGURA 20 - EFEITO DOS AGENTES GELEIFICANTES NO ENRAIZAMENTO DE BROTO DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO  $\frac{1}{2}$ QL SEM AUXINA (a, b, c); SUPLEMENTADO COM  $0,98 \mu\text{M}$  DE AIB (d, e, f); SUPLEMENTADO COM  $9,80 \mu\text{M}$  DE AIB (g, h, i) E GELEIFICADO COM: (I) ÁGAR ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ); (II) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR ( $3:3 \text{ g.L}^{-1}$ ); (III) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA ( $3:3 \text{ g.L}^{-1}$ ) APÓS 30 DIAS DE CULTIVO. SETAS MOSTRAM A PRESENÇA DE CALOS (BARRA: 10mm).

Quando foi utilizado o meio  $\frac{1}{2}$ MS, para todas as variáveis avaliadas, o enraizamento foi significativamente afetado pela interação entre o agente geleificante e a concentração de AIB, com  $P = 0,0228$  para o número médio de raízes,  $P = 0,0000$  para porcentagem de brotos enraizados e presença de calos, e  $P = 0,0246$  para comprimento de raízes por explante.

Nesse meio de cultura, sem AIB ou suplementado com 0,49 ou 4,90  $\mu$ M AIB, para todas as variáveis avaliadas, melhores resultados foram obtidos quando o ágar foi parcialmente substituído por GM de cássia, sendo que os valores mais altos para a porcentagem de enraizamento (84,77%), número de raízes e comprimento de raízes foram encontrados no meio contendo 0,49  $\mu$ M de AIB e geleificado com essa mistura (Tabela 12).

TABELA 12 - EFEITO DOS AGENTES GELEIFICANTES NO ENRAIZAMENTO DE BROTO DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO  $\frac{1}{2}$ MS SUPLEMENTADO OU NÃO COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE AIB APÓS 30 DIAS DE CULTIVO

Agente geleificante		Concentração de AIB ( $\mu$ M)		
		0	0,49	2,46
Brotos enraizados (%)	Ágar	9,81 $\pm$ 6,78 aC	30,63 $\pm$ 7,83 bA	20,00 $\pm$ 6,44 Bb
	Ágar:GM de guar	9,66 $\pm$ 8,57 aB	31,30 $\pm$ 11,6 bA	24,64 $\pm$ 6,14 bA
	Ágar:GM de cássia	13,23 $\pm$ 3,70 aC	84,77 $\pm$ 7,40 aA	53,94 $\pm$ 6,51 aB
Número de raízes por broto	Ágar	0,36 $\pm$ 0,38 bB	1,36 $\pm$ 0,27 bA	1,13 $\pm$ 0,38 bA
	Ágar:GM de guar	0,39 $\pm$ 0,37 bB	1,45 $\pm$ 0,75 bA	1,11 $\pm$ 0,52 bA
	Ágar:GM de cássia	1,06 $\pm$ 0,33 aC	3,07 $\pm$ 0,66 aA	2,41 $\pm$ 0,55 aB
Comprimento de raízes (cm)	Ágar	0,79 $\pm$ 0,18 bA	0,79 $\pm$ 0,21 bA	0,49 $\pm$ 0,08 bB
	Ágar:GM de guar	0,57 $\pm$ 0,21 bA	0,57 $\pm$ 0,20 bA	0,63 $\pm$ 0,17 bA
	Ágar:GM de cássia	1,07 $\pm$ 0,22 aA	1,23 $\pm$ 0,13 aA	1,04 $\pm$ 0,16 aA
Tamanho de calos*	Ágar	0,0	0,02 $\pm$ 0,04 bB	1,81 $\pm$ 0,14 bA
	Ágar:GM de guar	0,0	0,60 $\pm$ 0,17 aB	2,23 $\pm$ 0,17aA
	Ágar:GM de cássia	0,0	0,12 $\pm$ 0,18 bB	1,05 $\pm$ 0,13 cA

\*Tamanho de Calos : escala de 0 a 3 foi usada, onde 0 = ausência de calo, 1 = calo pequeno, 2 = calo intermediário e 3 = calo grande.

Média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha (para cada uma das variáveis) não são significativamente diferentes como indicado pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

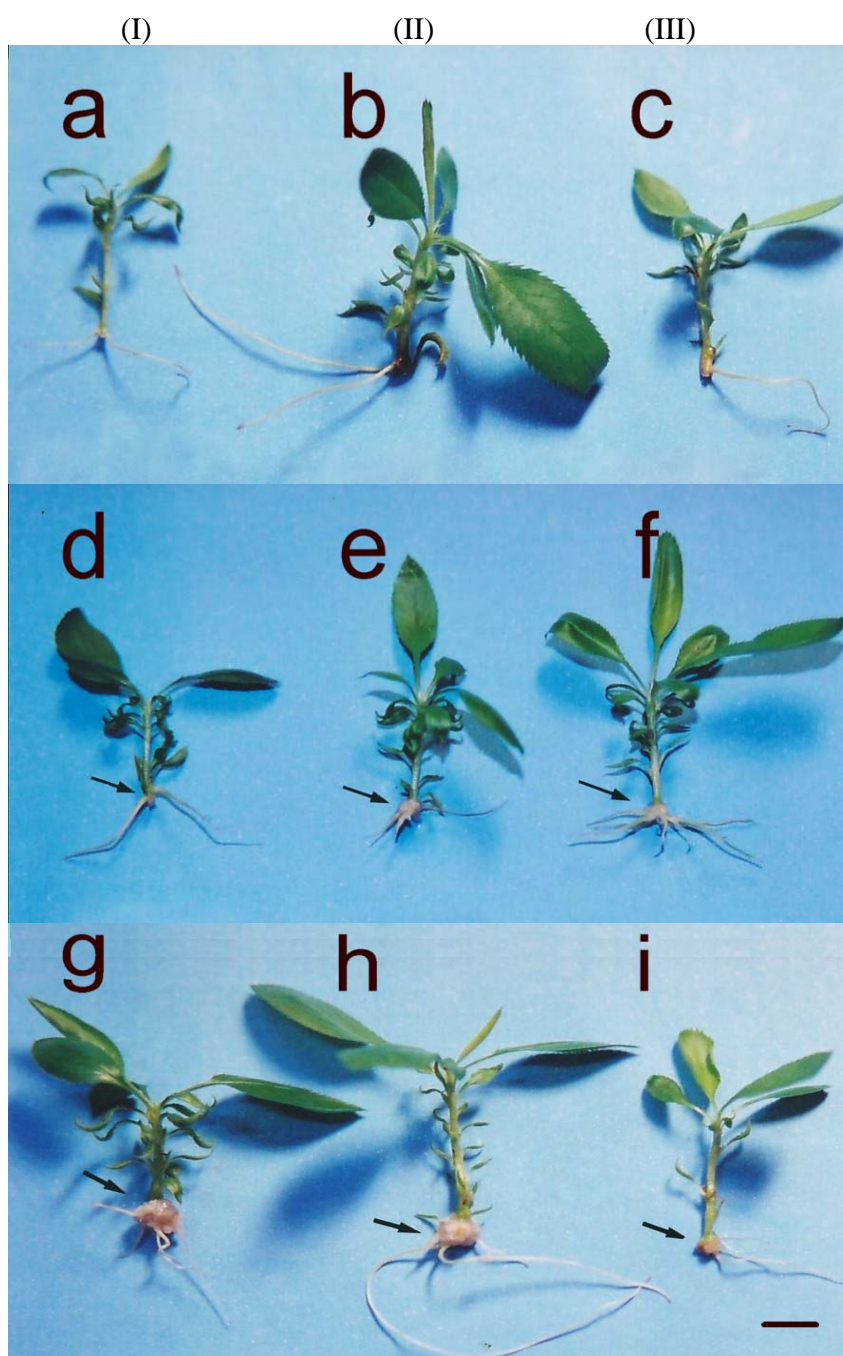


FIGURA 21 - EFEITO DOS AGENTES GELEIFICANTES NO ENRAIZAMENTO DE BROTOS DE PEREIRA (*Pyrus communis* L.) CULTIVAR DURONDEAU EM MEIO  $\frac{1}{2}$ MS SEM AUXINA (a, b, c); SUPLEMENTADO COM  $0,49 \mu\text{M}$  DE AIB (d, e, f); SUPLEMENTADO COM  $2,46 \mu\text{M}$  DE AIB (g, h, i) E GELEIFICADO COM: (I) ÁGAR ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ); (II) ÁGAR:GALACTOMANANA DE GUAR ( $3:3 \text{ g.L}^{-1}$ ); (III) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA ( $3:3 \text{ g.L}^{-1}$ ), APÓS 30 DIAS DE CULTIVO. SETAS MOSTRAM A PRESENÇA DE CALOS (BARRA: 10mm) .

A presença de calos foi observada em todos os meios, modificados ou não pela presença de GM, para as duas concentrações de AIB testadas (0,49 ou 2,46  $\mu\text{M}$  de AIB), sendo que no meio contendo 2,46 $\mu\text{M}$  de AIB o tamanho dos calos foi menor na mistura ágar:GM de cássia com diferença significativa em relação aos meios geleificados com a mistura ágar:GM de guar e somente ágar (Tabela 12, Figura 21).

Com relação aos dois meios basais testados maiores médias para todas as variáveis foram encontradas no meio  $\frac{1}{2}\text{QL}$  e geleificado com a mistura de ágar:GM de cássia.

Viseur (1987) utilizando meio de cultura suplementado com 8,05  $\mu\text{M}$  de ANA obteve 50% de enraizamento para a cultivar Durondeau. Resultado próximo ao encontrado no meio  $\frac{1}{2}\text{QL}$  suplementado com 9,8  $\mu\text{M}$  de AIB e geleificado somente com ágar. Entretanto a porcentagem de enraizamento foi 41,17 % menor que o valor obtido no presente trabalho para o meio geleificada com a mistura de ágar:GM de cássia (Tabela 11, pág. 86).

Para diferentes cultivares de pereira, Dolcet-Sanjuan; Mok e Mok (1990) testando meio MS com concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  reduzidas à metade, obtiveram maiores porcentagens de enraizamento e número de raízes quando altas concentrações de AIB (>10  $\mu\text{M}$ ) foram utilizadas. Entretanto, o tamanho dos calos também foi maior nestas condições.

#### 5.4.4. CONCLUSÕES

O uso das misturas ágar:GM (3:3 g.L<sup>-1</sup>) resultou em um aumento na proliferação e no comprimento dos brotos para a cultivar de pereira testada. Entretanto, não houve redução significativa na porcentagem de brotos hiperhídricos quando no meio utilizou-se as misturas de ágar:GM de guar ou cássia quando comparados com o meio controle contendo somente ágar;

Para o enraizamento no meio ½QL o melhor resultado foi obtido quando foi utilizada a mistura de ágar:GM de guar, suplementado com 0,98 µM de AIB (67% de explantes enraizados), inclusive com ausência total de calos;

No meio ½MS, o enraizamento da pereira teve melhor resultado com a mistura de ágar:GM de cássia suplementado com 0,49 µM de AIB (85% de explantes enraizados), apresentando calos de tamanho pequeno;

Com esses resultados observa-se a possibilidade da substituição parcial do ágar por GM e que não é necessária uma concentração tão alta de fitorregulador.

5.5. USO DE GALACTOMANANA COMO SUBSTITUTA PARCIAL  
DO ÁGAR NA MICROPROPAGAÇÃO DE MORANGUEIRO  
(*Fragaria x ananassa* DUCHESNE.) CV. PELICAN

### 5.5.1. INTRODUÇÃO

O morangueiro é uma planta herbácea, rasteira e perene da família das Rosáceas amplamente distribuída pela Europa, norte da Ásia, África e Estados Unidos (DEBNATH, 2003).

O cultivo racional do morangueiro é relativamente recente e teve início a partir do século XIX. As cultivares existentes são obtidas mediante hibridações e seleções. A cultivar *Fragaria*  $\times$  *ananassa* Duchesne, um híbrido entre *F. virginiana* (morangueiro da Virgínia), *F. chilensis* (morangueiro do Chile) e *Fragaria ovalis*, é uma das espécies de morangueiro mais amplamente cultivadas (TESSARIOLI NETO; ORTIGOZA e VERDIAL, 2003). Seus frutos são predominantemente utilizados para a produção de sucos e geléias (GEORGE, 1993). Apreciado no mundo inteiro, o morango tem grande mercado nas principais economias mundiais. Os Estados Unidos – maior produtor mundial da fruta fresca, com cerca de 750 mil toneladas – são líderes também na produção da fruta congelada, tendo produzido em torno de 195 mil toneladas na safra de 97/98 (MADAIL; REICHERT e MARTINS, 2003).

No Brasil, a produção de morango advém, na sua maioria, de explorações de propriedades de base familiar, nos estados do Sul e do Centro-Oeste do País (HAMERSCHMIDT, 1996; GROOPO, TESSAROLI NETO e BLANCO, 1997). A produção nacional em 1999 alcançou um volume aproximado de 90 mil toneladas de morangos cultivados em uma área de aproximadamente 3.500 ha (MADAIL; REICHERT e MARTINS, 2003). O aspecto que desperta o interesse pela exploração dessa atividade é a rentabilidade que proporciona (224%), quando comparado a outras culturas, como o milho (72%) e a soja (2%). No Paraná, quarto pólo de produção, a região do Norte Pioneiro é o maior produtor do Estado, com destaque para o Município de Pinhalão, cuja produção em 1998 foi de 3.620 toneladas. Curitiba é a segunda região produtora que, no mesmo ano produziu 2.788 toneladas de morango (MADAIL; REICHERT e MARTINS, 2003).

Convencionalmente, o morangueiro é propagado vegetativamente por meio de estolões emitidos pela planta (TESSARIOLI NETO; ORTIGOZA e VERDIAL, 2003). Em geral, a cultura para a produção de frutos é renovada anualmente. Devido a este tipo de multiplicação ocorre a disseminação de muitos parasitas como vírus, micoplasmas, fungos do solo, nematóides, os quais são transmitidos direta ou indiretamente pelos estolões produzidos (BOXUS; QUOIRIN e LAINE, 1977).



Boxus, em 1974, foi o primeiro a descrever o método de micropropagação *in vitro* de morangueiro por meio de multiplicação de brotos axilares. O meio de cultura utilizado continha macronutrientes de Knop (KNOP, 1965) e micronutrientes e compostos orgânicos do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) tem sido utilizado juntamente com o MS basal na micropropagação da maioria dos cultivares de morangueiro (ANDERSON; ABBOT e WILTSHIRE, 1982; JEMMALI; BOXUS e KINET, 1992; KAUR et al., 2000).

Geralmente os meios de cultura são suplementados 4,44  $\mu\text{M}$  de BA na fase de multiplicação (BOXUS, 1974). O uso de combinações de diferentes fitorreguladores tem sido utilizadas para algumas cultivares (JEMMALI; BOXUS e KINET, 1992; CALVETE et al., 2000; CALVETE; KÄMPF e SUZIN, 2002). Para a fase de enraizamento, são utilizados meios com baixas concentrações (CALVETE; KÄMPF e SUZIN, 2002) ou ausência de fitorreguladores (BOXUS, 1974).

Atualmente o processo de micropropagação de morangueiro é usado comercialmente em muitos países (DEBNATH, 2003).

Com o objetivo de melhorar o processo e diminuir os custos da cultura de tecidos vegetais *in vitro*, foi testado o uso de misturas de ágar:galactomanana de guar, ágar:galactomanana de cássia e ágar:galactomanana de leucena na proporção de 3:3  $\text{g.L}^{-1}$  em comparação com o uso do ágar à 6  $\text{g.L}^{-1}$  como agentes geleificantes na multiplicação e enraizamento de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cultivar Pelican.

## 5.5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.5.2.1. Material vegetal

Plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cultivar Pelican, já estabelecidas *in vitro* foram fornecidas pelo Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da EMBRAPA-CPACT, Pelotas, Rio Grande do Sul.

### 5.5.2.2. Fase de multiplicação

Broto com 40 dias já estabelecidos *in vitro* em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  de BA foram utilizados para os testes de multiplicação. O mesmo meio de cultura, suplementado com a mesma concentração de BA e misturas de ágar:galactomanana de guar (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ), ágar:galactomanana de cássia (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ), ágar:galactomanana de leucena (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ) e ágar (6  $\text{g.L}^{-1}$ ), foram testados como agentes geleificantes.

Brotações foram individualizadas e explantes ( $\pm 1$  cm) foram inoculados em frascos de cultura (60mm de diâmetro x 80 mm de altura) contendo 30 mL de meio. Após 40 dias no meio de multiplicação, foram avaliados o número de brotos por explante e a massa fresca dos explantes (Figura 22).

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas, sendo a parcela principal constituída de quatro tratamentos (agentes geleificantes), sendo os explantes subcultivados por quatro vezes após 40 dias. Cada tratamento foi constituído por 8 unidades experimentais, cada unidade experimental sendo um frasco com 6 explantes, totalizando 48 explantes por tratamento.

### 5.5.2.3. Fase de enraizamento

Para a fase de enraizamento, brotos consistindo de duas folhas com  $\pm 1,5$  cm mantidos 40 dias no meio de multiplicação foram transferidos para frascos contendo 30 mL de meio com sais diluídos a metade ( $\frac{1}{2}\text{MS}$ ), e compostos orgânicos do MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de mio-inositol, 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, suplementado com 0,022  $\mu\text{M}$  de BA (PEREIRA et al., 1999), onde géis de ágar:GM de guar (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ), ágar:GM de cássia (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ), ágar:GM de leucena (3:3  $\text{g.L}^{-1}$ ) e ágar (6  $\text{g.L}^{-1}$ ) foram testados como suporte.

Após 30 dias no meio de enraizamento, o número de raízes por explante e o tamanho médio das raízes foram avaliados (Figura 22). Algumas plantas enraizadas foram transferidas para condições *ex vitro*.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas, sendo a parcela principal constituída de quatro tratamentos (agentes geleificantes) sendo os explantes subcultivados por três vezes após 30 dias. Cada tratamento continha oito unidades experimentais constituídas de 6 explantes cada, totalizando 48 segmentos por tratamento.

#### **5.5.2.4. Condições de cultura**

Para os ensaios de multiplicação e enraizamento, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura controlada de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  com luz fluorescente do tipo branca fria, intensidade de fluxo de fótons de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da UFPR.

#### **5.5.2.5. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa MSTATC (Michigan State University), versão 2.11. A homogeneidade das médias foi avaliada por análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

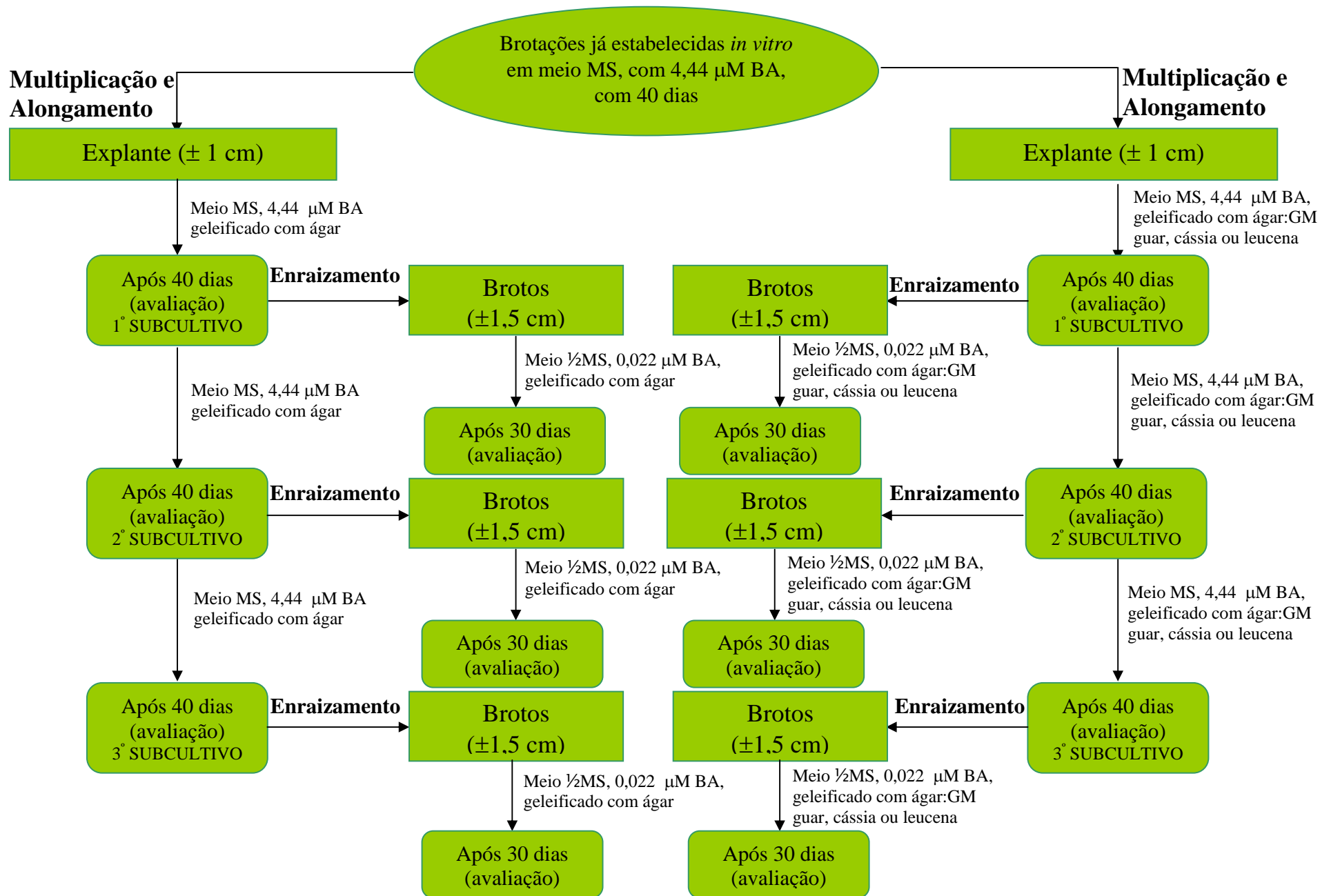


FIGURA 22 - FLUXOGRAMA BÁSICO DA MICROPROPAGAÇÃO DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* DUCHESNE) CV. PELICAN

### 5.5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.5.3.1. Multiplicação

Após seis semanas, os brotos iniciais cultivados em meio MS suplementado com 4,44  $\mu$ M de BA, modificado ou não, transformaram-se em tufo de brotações. Nessa fase, o uso de uma combinação de ágar e GM induziu melhor crescimento e uma maior proliferação de brotos, quando comparado ao meio geleificado com ágar somente. A mistura de ágar e GM de guar mostrou número mais elevado de brotos para todos os subcultivos, com um aumento de cerca de 120% no número de brotos, no primeiro subcultivo, quando comparado ao meio padrão contendo somente ágar como agente geleificante (Tabela 13, Figura 23). As misturas de ágar:GM de leucena e ágar:GM de cássia também induziram boa proliferação de brotos em todos os subcultivos. Os resultados mostraram diferença significativa se comparado com o controle no segundo subcultivo para esses dois meios modificados e no quarto subcultivo para o meio ágar:GM de leucena (Tabela 13). A massa fresca dos brotos também foi mais alta em todos os subcultivos quando plantas foram mantidas em meio contendo ágar:GM de guar. Porém, as plantas cultivadas em meio contendo GM de leucena mostraram brotos menores, logo com menor massa fresca dos explantes (Tabela 13, Figura 23). No meio somente com ágar alguns brotos mostravam-se cloróticos e senescentes, enquanto no meio geleificado com ágar:GM de guar os explantes eram verdes e saudáveis. Sintomas de hiperhidricidade não foram observados nos meios modificados ou não pela presença de GM.

Em estudos realizados por Singha; Townsend e Oberly (1990) e Podwyszynska e Olszewski (1995), com marmelo e alguns cultivares de rosa, respectivamente, também foram observados sintomas de clorose ou necrose dos brotos e folhas amareladas com baixa taxa de multiplicação, quando ágar foi utilizado como agente geleificante no meio de cultivo. Segundo os autores, a necrose dos brotos é uma desordem fisiológica relacionada à transpiração reduzida e baixos níveis de cálcio dos explantes. Esses problemas são causados pela exsudação da água (sinerese) do meio de cultivo para o ambiente (frasco). Esta sinerese aumenta a umidade do ar no interior do sistema e deixa o gel com uma consistência maior e, conseqüentemente, limita a difusão dos nutrientes do meio para os explantes.

TABELA 13 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* DUCHESNE) CULTIVAR PELICAN EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM 4,44  $\mu\text{M}$  DE BA APÓS 40 DIAS DE CULTIVO

Agente Geleificante	Subcultivo			
	Primeiro	Segundo	Terceiro	Quarto
Número de brotos Por explante				
Ágar	5,04 $\pm$ 0,69 bC	6,96 $\pm$ 1,06 cB	8,87 $\pm$ 1,93 bA	9,50 $\pm$ 1,78 cA
Ágar:GM de guar	11,00 $\pm$ 2,01 aB	10,38 $\pm$ 1,50 aB	11,67 $\pm$ 1,74 aB	14,60 $\pm$ 1,05 aA
Ágar:GM de cássia	5,50 $\pm$ 1,03 bB	8,69 $\pm$ 1,10 abA	7,81 $\pm$ 1,32 bA	7,15 $\pm$ 0,65 dAB
Ágar:GM de leucena	6,44 $\pm$ 0,88 bC	9,92 $\pm$ 1,26 aAB	8,96 $\pm$ 0,70 bB	11,44 $\pm$ 1,28 bA
Massa fresca Dos brotos (g)				
Ágar	0,187 $\pm$ 0,04 bC	0,305 $\pm$ 0,05 abB	0,375 $\pm$ 0,05 aAB	0,389 $\pm$ 0,07 aA
Ágar:GM de guar	0,438 $\pm$ 0,04 aA	0,390 $\pm$ 0,10 aA	0,432 $\pm$ 0,06 aA	0,456 $\pm$ 0,10 aA
Ágar:GM de cássia	0,223 $\pm$ 0,06 bB	0,386 $\pm$ 0,06 aA	0,429 $\pm$ 0,13 aA	0,284 $\pm$ 0,06 bB
Ágar:GM de leucena	0,198 $\pm$ 0,05 bA	0,243 $\pm$ 0,06 bA	0,260 $\pm$ 0,07 bA	0,268 $\pm$ 0,08 bA

Médias  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha (para cada uma das variáveis) não são significativamente diferentes como indicado pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

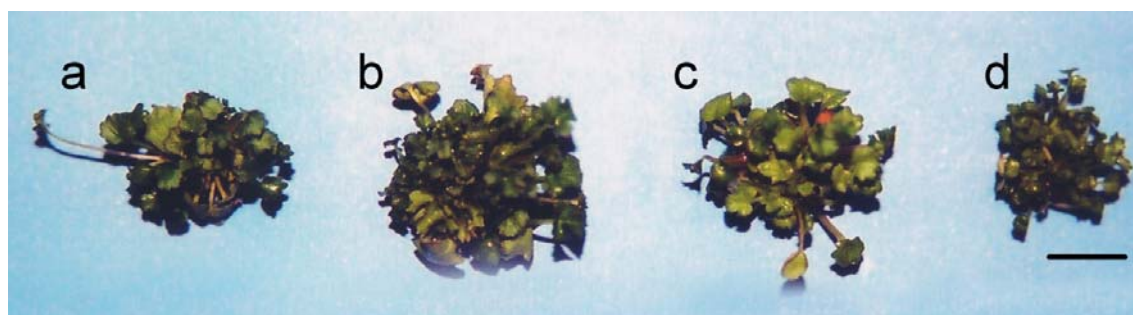


FIGURA 23 - BROTO DE MORANGUEIRO (*Fragaria x Ananassa* DUCHESNE) CULTIVAR PELICAN EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM 4,44  $\mu\text{M}$  DE BA E GELEIFICADO COM: (a) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>); (b) ÁGAR:GM DE GUAR (3:3g.L<sup>-1</sup>); (c) ÁGAR:GM DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>); (d) ÁGAR:GM DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>) APÓS 40 DIAS DE CULTIVO.

### 5.5.3.2. Enraizamento

Depois de quatro semanas em meio de enraizamento, os brotos produziram plantas jovens normais com muitas raízes (Figura 24). Todos os meios, modificados ou não, induziram 100% de enraizamento. Calos não foram observados na base dos explantes. As raízes começaram a ser visíveis oito dias após a transferência para os meios de enraizamento, modificados ou não pela presença de GM. Nesta fase, a mistura de ágar:GM de cássia teve um efeito estatisticamente significativo no número de raízes do primeiro subcultivo. No segundo subcultivo, o meio contendo somente ágar mostrou melhor resultado, mas nenhuma diferença significativa foi observada quando comparado com o meio geleificado com a mistura ágar:GM de guar. No terceiro subcultivo o meio com ágar mostrou uma diferença significativa para essa variável quando comparado com os meios geleificados com a mistura ágar:GM. O meio com ágar:GM de leucena induziu um menor número de raízes por explante para todos os subcultivos (Tabela 14). Quando foram utilizados os meios contendo mistura ágar:GM de guar e ágar:GM de cássia o comprimento das raízes foi maior. Elas eram mais grossas (Figura 24b, c) se comparadas com as raízes formadas no meio com ágar somente (Figura 24a). Uma redução significativa no comprimento das raízes foi registrada quando o meio foi geleificado com ágar:GM de leucena e estas raízes também apresentavam maior diâmetro que as raízes obtidas no meio geleificado somente com ágar (Tabela 14, Figura 24d).

Os resultados inferiores encontrados no meio geleificado com a mistura de ágar:GM de leucena, apesar do meio de cultura apresentar características de um gel mais macio em comparação com as outras GMs, podem ter sido obtidos pela grande quantidade de proteína encontrada na GM de leucena (em torno de 30%), a qual pode ter um efeito inibitório no enraizamento *in vitro* das plantas de morangueiro.

Behred e Mateles (1975) verificaram que suprimentos exógenos de aminoácidos inibiram o crescimento de culturas de células de tabaco, tomate, cenoura e soja quando nitrato ou uréia foram utilizados como fonte de nitrogênio, mas não quando amônio foi usado como fonte de nitrogênio.

TABELA 14 - EFEITO DO AGENTE GELEIFICANTE NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE MORANGUEIRO (*Fragaria x Ananassa* DUCHESNE)) CULTIVAR PELICAN EM MEIO ½MS SUPLEMENTADO COM 0,022 µM DE BA APÓS 30 DIAS.

Agente Geleificante	Subcultivo		
	Primeiro	Segundo	Terceiro
Número de raízes por explante			
Ágar	13,37±1,42 bcB	18,25±2,07 aA	20,27±3,45 aA
Ágar:GM de guar	14,14±3,35 abA	15,40±1,81 abA	14,83±2,17 bA
Ágar:GM de cássia	16,96±3,71 aA	13,92±2,69 bcB	16,61±2,79 bAB
Ágar:GM de leucena	10,90±1,40 cA	10,98±1,25 cA	13,52±2,47 bA
Comprimento das Raízes por explante (cm)			
Ágar	1,19±0,08 cB	1,15± 0,07 cB	1,50±0,07 bA
Ágar:GM de guar	1,77±0,13 aA	1,61± 0,10 bB	1,63±0,11 aB
Ágar:GM de cássia	1,54±0,08 bC	1,92± 0,08 aA	1,67±0,05 aB
Ágar:GM de leucena	0,32±0,06 dA	0,37± 0,05 dA	0,40±0,06 cA

Médias ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha (para cada uma das variáveis) não são significativamente diferentes como indicado pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

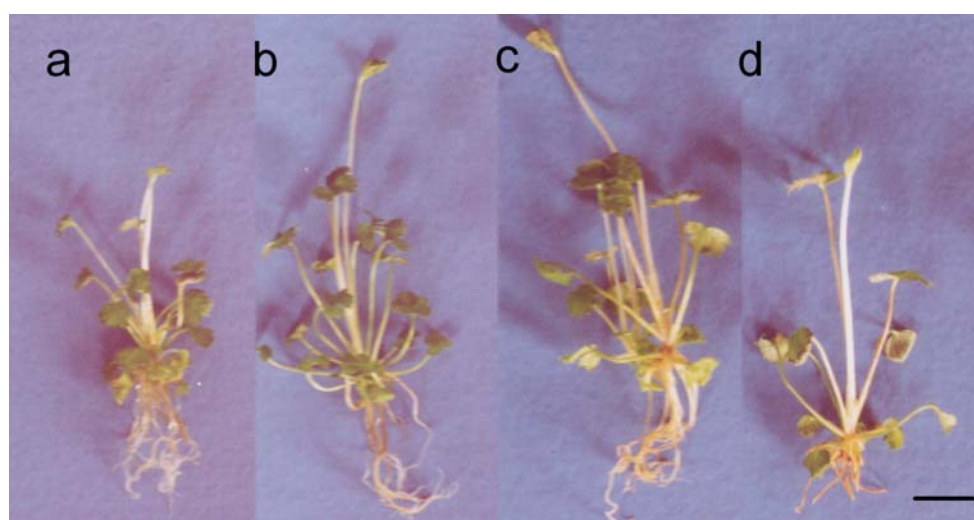


FIGURA 24 - BROTOS DE MORANGUEIRO (*Fragaria x Ananassa* DUCHESNE) CULTIVAR PELICAN APÓS 30 DIAS DE ENRAIZAMENTO EM MEIO ½MS SUPLEMENTADO COM 0,022 µM DE BA E GELEIFICADO COM: (a) ÁGAR (6 g.L<sup>-1</sup>); (b) ÁGAR:GM DE GUAR (3:3g.L<sup>-1</sup>); (c) ÁGAR:GALACTOMANANA DE CÁSSIA (3:3 g.L<sup>-1</sup>); (d) ÁGAR:GALACTOMANANA DE LEUCENA (3:3 g.L<sup>-1</sup>).



Sriskandarajah; Skirvin e Abu-Qaoud (1990) e Druart (1997) em estudos de enraizamento de macieira observaram que a presença de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  em grande quantidade inibiu o aparecimento e crescimento de raízes, o que foi caracterizado por uma diminuição do número e comprimento médio de raízes, e redução na porcentagem de enraizamento desta espécie.

Grattapaglia e Machado (1998) informaram que o sistema de raízes, obtido *in vitro* também determina o sucesso do transplante para condições *ex vitro*, sendo que raízes curtas são mais adequadas para a aclimatização da planta desde que estejam em uma fase ativa de crescimento. Logo, raízes mais curtas obtidas no meio onde ágar foi parcialmente substituído por GM de leucena (Figura 24) provavelmente se adaptarão mais facilmente às condições *ex vitro*, o que é um aspecto positivo. Ao contrário, as raízes mais finas (com menor diâmetro) observadas no meio geleificado somente com ágar constituem uma desvantagem, já que a remoção das plantas do meio de cultivo, bem como sua limpeza podem causar danos às raízes, e sua adaptabilidade ao campo seria prejudicada.

As plantas transferidas para condições *ex vitro* foram aclimatizadas com sucesso. Depois de oito meses de cultivo, produziram frutos normais (Figura 25).



FIGURA 25 - DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE MORANGUEIRO ENRAIZADAS *IN VITRO* EM MEIO MODIFICADO (MISTURA DE ÁGAR:GALACTOMANANA) OITO MESES DEPOIS DE TRANSPLANTADAS PARA O SOLO.

#### 5.5.4. CONCLUSÕES

Misturas de ágar:GM podem ser utilizadas como agentes geleificantes no meio de micropropagação de morangueiro, tanto na fase de multiplicação como na de enraizamento;

Na multiplicação *in vitro* de morangueiro o melhor resultado foi obtido com a mistura de ágar:GM de guar em meio MS suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  de BA;

Em relação ao enraizamento de morangueiro não houve diferença estatisticamente significativa entre os meios contendo as misturas de ágar:GM e ágar sozinho, em relação ao número de raízes por explante, porém foi possível observar que a qualidade das raízes foi melhor para todos os meios modificados.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

A aplicação de misturas ágar:galactomanana como géis influenciaram positivamente a micropropagação de macieira, pereira e morangueiro e organogênese indireta de tabaco. Foram observadas vantagens como diminuição da hiperhidricidade e formação de calos, aumento do número de brotos e porcentagem de enraizamento. Esses resultados podem estar relacionados com a formação de géis menos rígidos que permitem uma melhor difusão de nutrientes, fitorreguladores e água para os explantes.

Assim, é possível fazer a substituição parcial do ágar por galactomananas e empregar os sistemas como géis suportes de interesse biotecnológico em cultura de tecidos vegetais.

Em relação ao uso de goma guar, utilizada comercialmente como substituta parcial do ágar, a formulação aqui apresentada conduz a uma grande redução de custo em relação ao meio de cultura final. O preço do ágar varia entre U\$ 100-200/kg (dependendo do tipo e marca), enquanto a goma guar tem um custo de cerca de U\$ 3/kg. Já que 50% do ágar é substituído, pode ocorrer uma economia de 17-34 vezes no preparo do meio de cultivo.

## 7. ESTUDOS COMPLEMENTARES E PERSPECTIVAS

Medidas da pressão osmótica e de tensão superficial dos géis poderão diagnosticar melhor a regulação do turgor celular e de transporte de água e nutrientes através dos meios;

Aplicação de géis para o encapsulamento de sementes e de galactomananas em meios líquidos verificando se há melhor estímulo para a formação de raízes laterais com a melhoria do sistema radicial;

Análises reológicas com varredura de temperatura poderão verificar se há alteração da temperatura de fusão do meio misto em relação ao controle;

Aplicação de outras metodologias para a extração e verificação da presença de outros componentes associados as galactomananas, poderão evidenciar se o biopolímero tem a função de molécula bioativa ou somente traz o benefício como melhor suporte.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, A. J.; WHITELEY, E. Culture of *Malus* tissues *in vitro*. I. Multiplication of apples plants from isolated shoot apices. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 4, p. 183-189, 1976.
- ACKERS, G. K.; STEERE, R. L. Restricted diffusion of macromolecules through agar-gel membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 59, n. 1, p. 137-149, maio 1962.
- ADAMS, G. A. Acid hydrolysis of weak linkages. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 285-287, 1965.
- AMARAL, J. **Estudo reológico da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa***. Curitiba, 1998. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- ANDERSON, H. M.; ABBOTT, A. J.; WILTSHIRE, S. Micropropagation of strawberry plants *in vitro*- effect of growth regulators on incidence of multi-apex abnormality. **Scientia Horticulturae**, v. 16, p. 331-341, 1982.
- ANDERSON, W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, p. 343-347, 1984.
- ARAKI, C. Fractionation of ágar-ágar. **Journal Chemical Society Japan**, Tokyo, v. 58, p. 1338, 1937.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 261-296.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do sul. Guia de Identificação e interesse ecológico**, 2002. 326 p.
- BAIARD, J. K. **Industrial gums, polysaccharides and their derivatives**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 605-618.
- BAJAI, Y. P. S.; NIETSCH, P. In vitro propagation of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 26, p. 883-890, 1975.
- BAKER, G. L.; CARROW, J. W.; WOODMANSEE, C.W. Three element colloids make better low-solids gels. **Food Industry**, v. 21, p. 617-619, 1949.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. 199 p.
- BARROS, L. M. Embriogênese somática. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 7, p. 36-40, 1999.
- BEHREND, J.; MATELES, R. I. Nitrogen metabolism in Plant Cell suspension cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 56, p. 584-589, 1975.

BHATTACHARYA, P.; DEY, S.; BHATTACHARYYA, B. C. Use of low-cost gelling and support matrices for industrial scale plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 37, p. 15-23, 1994.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1994. 1234 p.

BILLMEYER JR., F. W. Rheology and the mechanical properties of Polymers. In:.....**Textbook of Polymer Science**. 3 ed. New York : John Wiley & Sons, 1984. p. 301-329.

BLAKESLEY, D.; WESON, G. D.; HALL, J. F. The role of endogenous auxin in root initiation. **Plant Growth Regulation**, Dordresh, v. 10, p. 341-353, 1991.

BONNETT, T.; TORREY, J. G. Chemical control of organ formation in root segments of *Convolvulus* cultured in vitro. **Plant Physiology**, Rockville, v. 40, p. 1228-1236, 1965.

BOXUS, PH. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. **The Journal of Horticultural Science**, Gembloux, v. 49, p. 209-210, 1974.

BOXUS, PH.; QUOIRIN, M.; LAINE, J. M. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In: REINERT, J.; BAJA, Y. P. S. (Ed.). **Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p. 131-143.

BREWBAKER, J. L.; HYLIN, J. W. Variations in mimosine content among *Leucaena* species and related mimosaceae. **Crop Science**, Madison, v. 5, p. 348-349, 1965.

BROWN, D. C. W.; LEUNG, D. W. M.; THORPE, T. A. Osmotic requirement for shoot formation in *Tobacco* callus. **Phisiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 46, p. 36-41, 1979.

BUIATTI, M.; BENNICI, A. Callus formation and habituation in *Nicotiana* species in relation to the especific ability for dedifferentation. **Lincei-Rend. Sci. Fis. Mat. Nat.**, v. 48, p. 261-269, 1970.

CACHO, M.; MORAN, M.; HERRERA, M. T.; FERNANDEZ-TARRAGO, J.; CORCHETE, M. P. Morphogenesis in leaf, hypocotyl and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured in vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, p. 117-123, 1991.

CAIRNS, P.; MILES, M. J.; BROWNSEY, G. J. X-ray fibre diffraction studies of synergistic, binary polysaccharides gels. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 160, p. 411-423, 1987.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas 2**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 37-70.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas 1**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, 1998. p. 87-132.

CALLEBERG, E. K.; JOHANSSON, L. B. The effect of starch and incubation temperature in anther culture of potato. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, p. 27-34, 1993.

- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; BERGAMASCHI, H.; DAUDT, R. H. S. Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro, durante a aclimatização *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 18, n. 3, 2000.
- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, 2002.
- CARLSON, W. A.; ZIEGENFUSS, E. M.; OVERTON, J. D. Food Technology feature: compatibility and manipulation of guar gum. **Food Technology**, Chicago, v. 16, p. 50-54, out. 1962.
- CASTRO, P. R. C.; CARRER, C. R. O.; AMARAL, V. Efeitos de reguladores vegetais no desenvolvimento do guar, *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 253-264, 1988.
- CHAPLIN, J. F.; BURK, L. G. Plant Propagation. In: Technical Bulletin 1596, U. S. Department of Agriculture. **Nicotiana – Procedures for experimental use**, 1980. p. 28-32.
- CHARLTON, W. A. Bud initiation in excised roots of *Linaria vulgaris*. **Nature**, London, v. 207, p. 781-782, 1965.
- CHAUVIN, J.E.; MARHADOUR, S.; COHAT, J.; LENARD, M. Effects of gelling agents on *in vitro* regeneration and kanamycin efficiency as a selective agent in plant transformation procedures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, p. 213-217, 1999.
- CHEN, J.; DICKINSON, E. Viscoelastic properties of heat-set wheat protein emulsion gels. **Journal Texture studies**, Auckland, v. 29, p. 285-304, 1998.
- CHENG, T-Y. Clonal propagation of woody plant species through tissue culture techniques. **Proc. Intl. Plant Prop. Soc.**, v. 28, p. 139-155, 1978.
- CHNG, R. C. O.; GOH, C-J. High frequency direct shoot regeneration from corm axillary buds and rapid clonal propagation of taro, *Colocasia esculenta* var. *esculenta* (L.) Schott (Araceae). **Plant Science**, Oxon, v. 104, p. 93-100, 1994.
- CHRISTOU, P. Habituation in *in vitro* Soybean cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 809-812, 1988.
- CHUDZIKOWSKI, R. J. Guar gum and its applications. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, Oxford, v. 22, p. 43-60, 1971.
- CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 19, p. 16-21, 2001.
- COSTA, N. L.; MAGALHÃES, J. A.; TOWNSEND, C. R.; LOPES, E. A. **Leucena**. Disponível em: <http://www.florestasite.com.br/leucena>> Acesso em: 02 jun. 2004.
- COUTINHO, E. F.; MALGARIM, M. B.; SOUZA, E. L.; TREPTOW, R. O. Qualidade pós-colheita da pêra (*Pyrus communis* L.) cultivar Carrick submetida a diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 417-420, 2003.

DE KLERK, G-J.; BRUGGE, J. T.; MARINOVA, S. Effectiveness of indolacetic acid, indolbutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 39-44, 1997.

DEA, I. C. M. The role of the structural modification in controlling polysaccharide functionality. In: YALPANI, M. (Ed.). **Industrial Polysaccharides: genetic engineering, structure, property relations and applications**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987. p. 207-216.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions on seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry**, San Diego, v. 31, p. 241-312, 1975.

DEA, I. C. M.; BLANSHARD, J. M. V.; MITCHEL, J. R. In: **Polysaccharides in food**. London: Butterworths, 1979. p. 229-247.

DEA, I. C. M.; CLARK, A. H. Effect of galactose-substitution-patterns on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 147, p. 275-297, 1986.

DEA, I. C. M.; McKINNON, A. A.; REES, D. A. **Journal of Molecular Biology**, v. 68, p. 153-172, 1972.

DEALY, J. M.; BROADHEAD, T. O. Rheometry for process control. In: COLLYER, A. A. (Ed.). **Techniques in Rheological measurement**. New York: Chapman & Hall, 1993. p. 285-324.

DEBERGH, P. C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 59, p. 270-276, 1983.

DEBERGH, P. C. Micropropagation of woody species state of the art on *in vitro* aspects. **Acta Horticulturae**, New York, v. 227, p. 287-295, 1988.

DEBERGH, P. C.; HARBAOUI, Y.; LEMEURE, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 53, p. 181-187, 1981.

DEBNATH, S. C. Micropropagation of small fruits. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 465-506.

DEUEL, H.; NEUKON, H. Some properties of locust bean gum. **Advances in Chemistry Series**, Oxford, v. 11, p. 51-61, 1954.

DEY, P. M. Biochemistry of plant galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry**, San Diego, v. 35, p. 341-376, 1978.

DHINDSA, R. S.; BEASLEY, C. A.; TING, I. P. Osmoregulation in cotton fiber. **Plant Physiology**, Rockville, v. 56, p. 394-398, 1975.

DOERSCHUG, M. R.; MILLER, C. O. Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants. **American Journal of Botany**, New York, v. 54, p. 410-413, 1967.

DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D. W. S.; MOK, M. C. Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, p. 191-199, 1990.

DOUBLIER, J. L.; CASTELAIN, C.; LEFEBVRE, J. Viscoelastic properties of mixed polysaccharides systems. In: MEUSER, F.; MANNERS, D. J.; SEIBEL, W. (Ed.). **Plant Polymeric carbohydrates**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. p. 76-85.

DOUGLAS, C.; ROUTLEY, R. **Grains and legumes**. Disponível em: <http://www.rirdc.gov.au/newcrops/5%20%20new%20crops%20grains%20and%20legumes.pdf> Acesso em: 01 mar. 2005.

DRIESSEN, A. C.; SOUZA FILHO, J. J. C. Produção de mudas. In: EMPASC. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, 1986. p. 92-132.

DRUART, PH. **Contribution à l'élaboration de techniques de production en masse *in vitro* d'espèces ligneuses utilisables en culture fruitière** – Ph. D. Thesis, Fac. Sci. Agron., Gembloux, 1987.

DRUART, PH. Optimization of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 67-77, 1997.

DRUART, PH. Micropropagation of apples. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. London: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 433-463.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUCKOWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 16, p. 189-197, 1971a.

DUCKOWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar. Part II. The use of a bacterial agarose to elucidate structural features of the charged polysaccharides in agar. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 16, p. 435-445, 1971b.

DUFOUR, M. Improving yield of adventitious shoots in apple. **Acta Horticulturae**, New York, v. 280, p. 51-60, 1990.

DZIEZAK, J. D. A focus on gums. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 3, p. 116-132, 1991.

EBRAHIM, M. K. H.; IBRAHIM, I. A. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 86, p. 211-221, 2000.

ECHEVERRIGARAY, S.; MOSSI, A. J.; MUNARI, F. Micropropagation of raisin tree (*Hovenia dulcis* Thumb) through axillary bud culture. **Journal Plant Biochemistry Biotechnology**, Duluth, v. 7, n. 2, p. 99-102, 1998.

EDWARDS, M.; BULPIN, P. V.; DEA, I. C. M.; REID, J. S. G. Biosynthesis of legume-seed galactomannans *in vitro*. Cooperative interactions of a guanosine 5'-diphosphate-mannose-



linked (1→4)-β-D-galactosyltransferase and in particulate enzyme preparations from developing endosperms of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) and guar (*Cyamopsis tetragonoloba* [L.] Taub.). **Planta**, Berlin, v. 178, p. 41-51, 1989.

EDWARDS, M.; SCOTT, C.; GIDLEY, M. J.; REID, J. S. G. Control of mannose/galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. **Planta**, Berlin, v. 187, p. 67-74, 1992.

ENDREB, R. **Plant Cell Biotechnology**. New York: Springer-Verlag, 1994. 353 p.

ENRIQUEZ, L. G.; HWANG, J. W.; HONG, G. P.; BATI, N. A.; FLICK, G. J. Plant and microbial food gums. In: CHARALAMBOUS, G.; DOXASTAKIS, G. (Ed.). **Food emulsifiers: chemistry, technology, functional properties and applications**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 335-361.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 293-295, 2002.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; BRAGA, E. J. B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 275-277, 2004.

FARIAS, J. J.; SILVA, D. S.; QUEIROZ FILHO, J. L. Aspectos produtivos de leucena (*Leucaena Leucocephala* (Lam.) Wit) em diferentes alturas e intervalos de cortes. Disponível em: <http://www.sbz.org.br/eventos/PortoAlegre/homepagesbz> Acesso em: 02 jun. 2004.

FARKAS, E.; GLICKSMAN, M. Hydrocolloid rheology in the formulation of convenience foods. **Food Technology**, Chicago, v. 21, p. 49-52, abr. 1967.

FASOLO, F. M.; PREDIERI, S. *In vivo* rooting of gf 655-2 peach rootstock and kiwi cv. "Hayward" microcuttings. **Acta Horticulturae**, New York, v. 227, p. 500-503, 1988.

FERNANDES, P. B.; GONÇALVES, M. P.; DOUBLIER, J. L. Effect of galactomannan addition on the thermal behaviour of k-carrageenan gels. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 19, p. 261-269, 1992.

FERRI, V. C.; CENTELLAS, A. Q.; HELBIG, V. E.; FORTES, G. R. L. Uso de ágar, amido e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira MM 111. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 4, p. 561-565, 1998.

FIORINO, P.; LEVA, A. R. Propagation of apple cultivars. **Acta Horticulturae**, v. 131, p. 95-99, 1983.

FIORINO, P.; LORETI, F. Propagation of fruit trees by tissue culture in Italy. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, n. 3, p. 353-358, 1987.

FULLER, K. W.; GALLON, J. R. Plant Physiology and Biotechnology. In: HOPKINS, W. G. (Ed.). **Introduction to Plant Physiology**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995. p. 445-453.

- GAMBORG, O. L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 45, p. 372-375, 1970.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exptl. Cell Res.** v. 50, p. 151-158, 1968.
- GAMBORG, O. L.; SHYLUK, J. The culture of plant cells with ammonium salts as the nitrogen source. **Plant Physiology**, Rockville, v. 45, p. 598-600, 1970.
- GANTER, J. L. M. S. **Galactomanana de sementes de *Mimosa scabrella* (Bracatinga)**. Curitiba, 1988. 135 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Water-soluble galactomannans from seeds of *Mimosaceae* spp. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 55-62, 1999.
- GANTER, J. L. M. S.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; REICHER, F. J. Structural studies on galactomannan from Brazilian seeds. **Carbohydrate Chemistry**, v. 12, p. 753-767, 1993.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Oxon, v. 32, p. 272-289, out./dez. 1996.
- GAUTHERET, R. J. **La culture des Tissus Vegetaux, Techniques et Realisations**. Paris: Masson Cie, 1959. 863 p.
- GENERAL MILLS, INC., Yueh, M.H.; Schilling, E.D. **Calcium salts of carboxymethyl galactomannans**. Int. Cl. C 08b, A 23l, C01f. Fr. n. 2,080,462. 17 Dec 1971; US Appl. 8440, 03 Feb 1970; 13 pp. **Chemical Abstract**, Ohio, v. 77, n. 16, p. 103 (103610t), out. 1972.
- GEORGE, E. F. **Plant Propagation by tissue culture: the technology**. Greit Britain: Exegetics Limited, v. 1, 1993. 574 páginas.
- GERMANO, S. **Heparinóides produzidos por modificação química em galactomananas de sementes de *Cassia fastuosa* Willd. e *Mimosa scabrella* Benth.** Curitiba, 1996. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 19-25.
- GLICKSMAN, M. Gelling hydrocolloids in food product applications In: BLANSHARD, J. M. V.; MITCHEL, J. R. (Ed.). **Polysaccharides in Food**. Butterworths: London, 1979. p.185-204.
- GLICKSMAN, M. Origins and classification of hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**. Oxford, v. 1, 1982. p. 3.
- GLICKSMAN, M. Red Seaweed Extracts (Agar, Carrageenan, Furcellaran) In: GLICKSMAN, M. (Ed.). **Food Hydrocolloids 2**. Boca Raton : CRC Press, 1983. p. 73-114.

- GLICKSMAN, M. Tara gums. In: GLICKSMAN, M. (Ed.). **Food Hydrocolloids 3**. Boca Raton: CRC Press, 1986. p. 185-189.
- GOLDSTEIN, A. M.; ALTER, E. N.; SEAMAN, J. K. Guar gum. In: WHISTLER R. L.; BEMILLER, J. N. (Ed.). **Industrial gums**. London: Academic Press, 1973. p. 303-321.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. V. 1. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.
- GROPPO, G. A.; TESSAROLI NETO, J.; BLANCO, S. G. **A cultura do morangueiro** (Boletim Técnico, 201). São Paulo: Cati – Secretaria da agricultura e do abastecimento, 1997. 27 p.
- GUERRA, M. P.; VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O.; DAL VESCO, L. L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 34, n. 9, p. 1557-1563, 1999.
- GUPTA, G. R.; GUHA, S.; MAHESHWARI, S. C. Differentiation of buds from leaves of *Nicotiana tabacum* L. in sterile culture. **Phytomorphology**, Delhi, v. 16, p. 175-182, 1966.
- HAMERSCHMIDT, I. Evolução da cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa*) no estado do Paraná. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 89, 1996.
- HARTREE, E. F. Determination of protein a modification as the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 48, p. 422-427, 1972.
- HELGESON, J. P. Tissue and cell suspension culture. In: Technical Bulletin 1596, U. S. Department of Agriculture. **Nicotiana Procedures for experimental use**, 1980. p. 52-59.
- HENDERSON, W. E.; KINNERSLEY, A. M. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 15: p. 17-22, 1988.
- HERALD, C. J. Guar Gum. In: GLICKSMAN, M. (Ed.). **Food Hydrocolloids 3**. Boca Raton: CRC Press, 1986a. p. 172-183.
- HERALD, C. J. Locust/Carob bean gum. In: GLICKSMAN, M. (Ed.). **Food Hydrocolloids 3**. Boca Raton: CRC Press, 1986b. p. 161-170.
- HIRIMBUREGAMA, K. GAMAGE, N. Propagation of *Bambusa vulgaris* ( yellow bamboo) through nodal bud culture. **The Journal of Horticultural Science**, Gembloux, v. 70, n. 3, p. 469-475, 1995.
- HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; VIEIRA, S. S. N. Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1371-1379, 2001.
- HU, C. Y.; SUSSEX, I. M. *In vitro* development of embryoids on cotyledons of *Ilex aquifolium*. **Phytomorphology**, Delhi, v. 21, p. 103-107, 1971.
- IBRAHIM, R. K.; THAKUR, M. L.; PERMANAND, B. Formation of anthocyanins in callus tissue cultures. **Lloydia**, v. 34, p. 175-182, 1971.

INDIRA, P.; RAMADASAN, A. Shoot formation from the callus tissue of hormone-treated cowpea leaves. **Current Science**, Bangalore, v. 36, p. 616-617, 1967.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: O INSTITUTO, 1985. 523 p.

IPEF, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais – Sementes, 2004. Disponível em: <http://www.ipef.br/sementes/detalhesnatexoticas.asp?Talhão=192>> Acesso em: 02 jun. 2004.

ISHII, Y.; TAKAMURA, T.; GOI, M.; TANAKA, M. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, n. 6-7, p. 446-450, 1998.

JAIN, N.; BABBAR, S. B. Gum katira – a cheap gelling agent for plant tissue culture media. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, p.223-229, 2002.

JEMMALI, A.; BOXUS, PH.; KINET, J. M. Are strawberry arising from adventitious stipule buds also true to type? **Acta Horticulture**, v. 319, p. 171-176, 1992.

JOÃO, P. L.; ROSA, J. I.; FERRI, V. C.; MARTINELLO, M. D. Levantamento da fruticultura comercial do Rio Grande do Sul. EMATER RS. **Realidade Rural**, Porto Alegre, v. 28, p. 17, 2002.

JONES, O. P. Propagation of apple *in vitro*. In: AHUJA, M. R. M. (Ed.). **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic publishers, 1993. p. 169-186.

KAPOOR, V. P.; BANERJI, R.; PRAKASH, D. Leguminous seeds: Potential Industrial Sources for gum, fat and protein. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 51, p. 1-22, 1992.

KATO, Y.; KAWAHARA, S. Bud formation in leaves, leaf fragments and mid-rib pieces of *Heloniopsis orientalis* (Liliaceae). **Planta**, Berlin, v. 107, p. 111-120, 1972.

KAUR, R.; MAHAJAN, R.; BHARDWAJ, S. V.; SHARMA, D. R. Meristem tip culture to eliminate strawberry mottle virus from two cultivars of strawberry. **Phytomorphology**, v. 50, n. 2, p. 192-194, 2000.

KNOP, W. Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen. **Landwirtsch. Vers. Stn.**, v. 7, p. 93-107, 1965.

KODA, T.; ICHI, T.; YAMAGISHI, H.; YOKSHIKAWA, H. Effects of phytohormones and gelling agents on plant regeneration from protoplasts of red cabbage. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 52, p. 2337-2340, 1988.

KOHLNBACH, H. W.; WERNICKE, W. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, v. 86, p. 463-472, 1978.

KONAR, R. N.; OBEROI, Y. P. *In vitro* development of embryoids on the cotyledons of *Biota orientalis*. **Phytomorphology**, Delhi, v. 15, p. 137-140, 1965.

KRUMEL, K. L.; SARKAR, N. Flow properties of gums useful to the food industry. **Food Technology**, Chicago, v. 29, p. 37-44, 1975.

KUHLMAN, U.; FOROUGH-WEHR, B. Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 8, p. 79-81, 1989.

KWON, B-D.; FOSS, P. A.; RHA, C. Rheological characterization of high viscosity polysaccharides. In: YALPANI, M. (Ed.). **Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and applications**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 253-266.

LANE, W. D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. **Plant Science letters**, Clare, v. 13, p. 281-285, 1978.

LAPASIN, R.; PRICL S. **Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 620 p.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical Applied Genetic**, New York, v. 60, p. 197-214, 1981.

LAWRENCE, A. A. **Natural gums for edible purposes**. New Jersey: Noyes Data Corporation, 1976. 337 p.

LEBLAY, C.; CHEVREAU, E.; RABOIN, L. M. Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 25, p. 99-105, 1991.

LEITE, D. L.; PETERS, J. A.; NAKUSA, H.-D. Efeito de solidificantes sobre a multiplicação e crescimento de gemas de pereira. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 41-49, 1993.

LEITE, G. B. **Efeito de reguladores de crescimento, substrato, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OHxf97**. 1995. 78 f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

LEITNER, S. C. S. **Estudo de polissacarídeos da semente de *Stryphnodendron barbatiman* (Barbatimão)**. Curitiba, 1991. 122 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LIMA-NISHIMURA, N.; QUOIRIN, M.; NADDAF, Y. G.; WILHELM, H. M.; RIBAS, L. L. F.; SIERAKOWSKI, M-R. A xyloglucan from seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell Report**, v. 21, p. 402-407; 2003.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 18, p. 100-127, 1965.

LOPES, S. C. ; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **CERNE**, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998. p. 151.

LUCYSZYN, N. **Galactomananas: novas fontes do biopolímero e aplicações na indústria alimentícia**, Curitiba, 1994. 190 f. Tese (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

LUCYSZYN, N.; SUGUI, J. A.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Application of the galactomannan from *Mimosa scabrella* (bracatinga) as starch substitute in food formulations. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NATURAL POLYMERS AND COMPOSITES – ISNAPOL/2000, 3; WORKSHOP ON PROGRESS IN PRODUCTION AND PROCESSING OF CELLULOSIC FIBRES AND NATURAL POLYMERS, 2000, São Pedro, SP, Brazil. **Natural Polymers and composites: proceedings**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária/USP-IQSC/Botucatu: UNESP, 2000. p. 233-237.

MADAIL, J. C. M.; REICHERT, L. J.; MARTINS, C. R. **Morango Pós colheita**. Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS). – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 28 p.

MAIER, H.; ANDERSON, M.; KARL, C.; MAQNUSON, K.; WHISTLER, R. L. Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. (Ed.). **Industrial Gums: Polysaccharides And Their Derivatives**. 3. ed. New York: Academic Press, 1993. p. 215-218.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de Biotecnologia de Plantas - uma introdução à engenharia genética de plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

MANZI, A. E.; MAZZINI, M. N.; CEREZO, A. S. The galactomannan system from the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 125, p. 127-143, 1984.

MAO, A. A.; WETTEN, A.; FAY, M. CALIGARI, P. D. S. *In vitro* propagation of Clerobrookanum Walp.; a potential natural anti-hipertension medicinal plant. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 8, p. 493-496, 1995.

MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). **Journal of Biotechnology**, Shannon, v. 89, p. 81-84, 2001.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, Shannon, v. 90, p. 329-333, 2003.

MARTIN, S. **Galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*: estrutura e propriedades**. Curitiba, 2003. 109 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

McCLEARY, B. V. Enzymic hydrolysis, fine structure, and gelling interaction of legume-seed D-galacto-D-mannans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 71, p. 205-230, 1979.

McCLEARY, B. V.; AMADO, R.; WAIBEL, R.; NEUKON, H. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 92, p. 269-285, 1981.

- MCCLEARY, B.V.; CLARK, A. H.; DEA, I. C. M.; REES, D. A. The fine structures of carob and guar galactomannans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 139, p. 237-260, 1985.
- MCCOWN, B.; LLOYD, G. Woody plant medium (WPM)- a mineral nutrients formulation for microculture of woody plant species. **Hortscience**, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 453, 1981.
- MELLO-FARIAS, P. C.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de pereira "Old Home x Farmingdale" 9. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 2, n. 2, p. 71-78, 1996.
- MERCÊ, A. L. R.; FERNANDES, E.; MANGRICH, A. S.; SIERAKOWSKI, M.-R. Evaluation of the complexes of galactomannan of *Leucaena leucocephala* and  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . **Journal Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 11, n. 3 p. 224-231, 2000.
- MERCÊ, A. L. R.; LOMBARDI, S. C.; MANGRICH, A. S.; REICHER, F.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M.-R. Equilibrium studies of galactomannan of *Cassia fastuosa* and *Leucaena leucocephala* and  $\text{Cu}^{2+}$  using potentiometry and EPR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 35, p. 13-20, 1998.
- MÍTZI, B. **Árvores nativas e exóticas do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528 p.
- MODGIL, M.; SHARMA, D. R.; BHARDWAJ, S. V. Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 179-188, 1999.
- MOHNEN, D.; EBERHAND, S.; MARFA, V. The control of root, vegetative shoot and flower morphogenesis in tobacco thin cell-layer explant (TCLS). **Development**, Cambridge, v. 108, p. 191-201, 1990.
- MONGE, E. S. **Flora Agrícola Tomo I**. Ministério da Agricultura, pesca e alimentacion – Secretaria General técnica. Madri: EDITA, 1994. 1294 páginas.
- MOREL, G. Producing virus-free Cymbidiums. **Am. Orchid Soc. Bull.**, v. 29, p. 495-497, 1960.
- MORRIS, E. R. Mixed polymer gels. In: HARRIS, P. **Food Gels**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 291-359.
- MORRIS, V. J.; MILES, M. J. Effect of natural modifications on the functional properties of extracellular bacterial polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, Alexandria, v. 8, p. 342-348, 1986.
- MURASHIGE, T. Plant Propagation through tissue cultures. **Ann. Ver. Plant Physiology**, v. 23, p. 135-165, 1974.
- MURASHIGE, T. Plant Cell and organ culture as horticultural practices. **Acta Horticulturae**, New York, v. 78, p. 17-30, 1977.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAIK, P. S.; SARKAR, D. Sago: and alternative cheap gelling agent for potato *in vitro* culture. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 293-296, 2001.

NAIRN, B. J.; FURNEAUX, R. H.; STEVENSON, T. T. Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of *Radiata pine*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, p. 1-11, 1995.

NAKASU, B. H.; LEITE, D. L. Indicação de porta-enxerto e cultivares de pereira para o sul do Brasil. **Hortisul**, Pelotas, v. 1, n. 2, p. 20-24, 1990.

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of Plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue, and Organ Culture**. New York: Springer-Verlag, 1977. p. 179-248.

NEUKON, H. Galactomannans: properties and applications. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, Zürich, v. 22, p. 41-45, 1989.

NORTON, S. P.; BOLL, W. G. Callus and shoot formation from tomato roots in vitro. **Science**, New York, v. 119, p. 220-221, 1954.

NUNES, J. C. O.; BARPP, A.; SILVA, F. C.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação do porta-enxerto 'Maruibakaido' (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal:São Paulo, v. 21, n. 2, p. 191-195, ago. 1999.

O'NEILL, M. A.; SELVENDRAN, R. R.; MORRIS, V. J. Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 124, p. 123, 1983.

ONO, L. **Atividade Antiviral de galactomananas modificadas por oxidação e/ou sulfatação**. Curitiba, 2004. 161 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I. M.; COIMBRA, T. L. M.; GORIN, P. A. J.; SIERAKOWSKI, M.-R. *In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**, v. 60, p. 201-208, 2003.

OSORIO, V. A.; FORTES, J. F. **Pêra. Fitossanidade**. Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS). – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 32 p.

OWENS, L. D.; WOZNIAK, C. A. Measurement and effects of gel matrix potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf discs. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 26, p. 127-133, 1991.

PASQUALETTO, P.-L.; ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. J. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple cultivars *in vitro*. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 111, n. 6, p. 976-980, 1986.

PASQUALETTO, P.-L.; ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. J. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 14, p. 31-40, 1988.



- PATRA, A.; RAI, B.; ROUT, G. R.; DAS, P. Successful plant regeneration from callus cultures of *Centella asiatica* (Linn.) Urban. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 24, p. 13-16, 1998.
- PAZUR, J. H. Neutral polysaccharides. In: CHAPLIN M. F.; KENNEDY, J. F. (Ed.). **Carbohydrate Analysis – A Practical Approach**. 2. ed. Oxford: IRL press, 1994. p. 73-124.
- PEREIRA, J. E. S.; BIANCHI, V. J.; DUTRA, L. F.; FORTES, G. R. L. Enraizamento *in vitro* do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) em diferentes concentrações do meio MS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p.17-20, 1999.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 417-420, 2001.
- PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 25, p. 44-48, 2002.
- PETKOWICZ, C. L. O. **Biopolímeros da semente de *Schizolobium amazonicum* (Pinho cuiabano): galactomananas e arabinanas**. Curitiba, 1993. 106 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- PETKOWICZ, C. L. O.; GANTER, J. L. M. S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of *Caesalpinaceae*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 737-743, 1998.
- PETKOWICZ, C. L. O.; REICHER, F.; CHANZY, H.; TARAVEL, F. R.; VUONG, R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 107-112, 2001.
- PHILLIPS, G. C.; HUBSTENBERGER, J. F. Micropropagation by proliferation of axillary buds. In: GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G. C. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. New York: Springer- Verlag GMBH & Co, 1995. p. 45-54.
- PHILLIPS, G. C.; HUBSTEMBERGER, J. F.; HANSEN, E. E. Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures. In: GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G. C. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. New York: Springer-Verlag GMBH & Co., 1995. p. 67-79.
- PIRES, L.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.-R. An active heparinoid obtained by sulphatation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 46, n.2, p. 165-169, 2001.
- PLANTA DE *Cyamopsis tetragonolobus*. Disponível em: [www.lamberty.com/technologies/guar.cfm](http://www.lamberty.com/technologies/guar.cfm)> Acesso em: 02 jun 2004.
- PODWYSZYNSKA, M.; OLSZEWSKI, T. Influence of gelling agents on shoot multiplication and uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 64, p. 77-84, 1995.

PRABHUDESAI, V. R.; NARAYANASWAMY, S. Differentiation of cytokinin-induced shoot buds and embryoids on excised petioles of *Nicotiana tabacum*. **Phytomorphology**, Delhi, v. 23, p. 133-137, 1973.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de *Prunus* sp. **Acta Horticulturae**, New York, v. 78, p. 437-442, 1977.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento in vitro de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 624-628, 2002.

RAJU, M.V. S.; MANN, H. E. Regeneration studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*. Anatomy of regeneration of leaves in stereli culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 48, p. 1887-1891, 1970.

RAJU, M.V. S.; MANN, H. E. Regeneration studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*. Patterns of regeneration of leaves in stereli culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 49, p. 2015-2021, 1971.

REES, D. A. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharides gels and networks. **Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry**, San Diego, v. 24, p. 267-332, 1969.

REES, D. A. Shapely polysaccharides. **Biochemistry Journal**, Tokyo, v. 126, p. 257-273, 1972.

REICHER, F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; FONTANA, J. D.; CORRÊA, J. B. C. Sees gum of *Stryphnodendron barbatiman* (Barbatimão). **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 28-29, p. 353-361, 1991.

REID, G. J. S. Galactomannans. In: DEY, P. M.; DIXON R. A. (Ed.). **Biochemistry of Storage Carbohydrates**. London: Academic Press, 1985. p. 265-286.

REINERT, J.; WHITE, P. R. The cultivation in vitro of tumor tissues and normal tissues of *Picea glauca*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 9, 177-189, 1956.

RING, S.; STAINSBY, G. Filler reinforcement of gels. **Prog. Food Nutr. Sci.**, v. 6, p. 323-329, 1982.

RIPETTI, V.; KEVERS, C.; GASPAR, T. H. Two successive media for the rooting of walnut shoots in vitro. **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v. 8, p. 29-32, 1994.

RODRIGUEZ, A. P. M.; VENDRAME, W. A. Micropropagation of tropical woody species. In: MOHAN, J. S.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 153-179.

ROMBERGER, J. A.; TABOR, C. A. The *Picea abies* shoot meristem in culture I. Agar and autoclaving effects. **American Journal of Botany**, New York, v. 58, p. 131-140, 1971.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 18, p. 91-120, 2000.

ROY, P. K.; SINGH, B.; MEHTA, S. L.; BARAT, S. K.; GUPTA, N.; KIRTI, P. B.; CHOPRA, V. L. Plant regeneration from leaf discs of *Lathyrus sativus*. **Indian Journal Experimental Biology**, New Delhi, v. 29, p. 327-330, 1991.

SÁ, J. P. G. **Leucena – Resultados da Pesquisa do Norte do Paraná**. Londrina: IAPAR – Informe da Pesquisa, n. 122, 1997. 32 p.

SAADAT Y. A.; HENNERTY, M. J. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, p. 251-260, 2002.

SANDERSON, G.R. Polysaccharides in food. **Food Technology**, Chicago, v. 35, p. 50-83, jul. 1981.

SANTA ROSA, J. O feijão guar: sua introdução no nordeste. **Revista de Química Industrial**, n. 544, p. 17-19, ago. 1977.

SARGENT, P. A.; KING, J. Investigation of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 52, p. 1747-1755, 1974.

SCHENK, R. O.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, p. 199-204, 1972.

SCHERER, P. A. Standardisation of plant micropropagation by usage of a liquid medium with polyurethane foam plugs or a solidified medium with the gellan gum gelrite instead of agar. **Acta Horticulturae**, New York, v. 226, p. 107-114, 1988.

SCHOLTEN, H. J.; PIERIK, R. L. M. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 230-235, 1998a.

SCHOLTEN, H. J.; PIERIK, R. L. M. Agar as a gelling agent: differential biological effects in vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 77, p. 109-116, 1998b.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A.; SILVA, L. C. Indução de brotações em gema apical e axilar do porta-enxerto de macieira ‘EM-9’ cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 361-362, 2003.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh) e Megumi (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 433-437, 1993.

SHARMAN, W. R.; RICHARDS, E. L.; MALCOLM, G. N. Hydrodynamic properties of aqueous solutions of galactomannans. **Biopolymers**, v. 28, p. 2817-2833, 1978

SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Editora Edgard Clucher Ltda, 1975. 184 p.

SHCHERBUKHIN, V. D. Galactomannans of native flora (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscou, v. 29, n.6, p. 599-606, 1993.

SHELTON, H. M.; BREWBAKER, J. L. *Leucaena leucocephala* – the most widely used forage tree legume. In: GUTTERIGE, R. C.; SHELTON, H. M. **Forage tree legumes in tropical agriculture**. Austrália: CAB International, 1994. p. 16-29.

SHIBLI, R. A.; AJILOUNI, M. M.; JARADAT, A.; ALJANABI, S.; SHATNAWI, M. Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, p. 237-242, 1997.

SHIGEMATSU, K.; MATSUBARA, H. The isolation and propagation of the mutant plant from sectorial chimera induced by irradiation in *Begonia rex*. **Journal Japanese Society Horticultural Science**, Kagawa, v. 41, p. 196-200, 1972.

SIERAKOWSKI, M-R.; FREITAS, R. A.; FUJIMOTO, J.; PETRI, D. F. S. Adsorption behaviour of oxidised galactomannans onto amino-terminated surfaces and their interaction with bovine serum albumin. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 49, n.2, p. 167-175, 2002.

SIERAKOWSKI, M-R.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 42, p. 1, p. 51-57, 2000.

SILBERBERG, A. Gelled aqueous systems. In: GLASS, J. E. **Polymers in aqueous media**. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 3-14.

SINGHA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus sp.* 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. **Journal of American Society Horticultural Science**, Alexandria, v. 107, n. 4, p. 657-660, 1982.

SINGHA, S. Influence of two commercial agars on *in vitro* shoot proliferation of 'Almey' Crabapple and 'Seckel' pear. **Hortscience**, Alexandria, v. 19, n. 2, p. 227-228, 1984.

SINGHA, S.; OBERLY, G. H.; TOWNSEND, E. C. Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and pear. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 11, p. 209-220, 1987.

SINGHA, S.; TOWNSEND, E. C.; OBERLY, G. H. Mineral nutrients status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentrations of three commercial agars. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 110, n. 3, p. 407-411, 1985.

SINGHA, S.; TOWNSEND, E. C.; OBERLY, G. H. Relation between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 23, p. 135-142, 1990.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SMITH, M. K.; DREW, R. A. Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 17, p. 267-289, 1990.

SMITH, R. H.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal of Botany**, New York, v. 57, p. 562-568, 1970.

- SOEDARJO, M.; BORTHAKUR, D. Simple procedures to remove mimosine from young leaves, pods and seeds of *Leucaena leucocephala* used as food. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxon, v. 31, p. 97-103, 1996.
- SONI, S. K.; BOSE, S. Seed galactomannans and their strutures. **J. Scient. Indust. Res.**, Calcutta, v. 44, p. 544-547, out. 1985.
- SORVARI, S. Comparison of anther cultures of barley cultivars in barley-starch and agar gelatinised media. **Annales Agriculturae Fenniae**, v. 25, p. 249-254, 1986a.
- SORVARI, S. Differentiaton of potato tuber discs in barley starch gelatinized nutrient media. **Annales Agriculturae fenniae**, v. 25, p.135-138, 1986b.
- SORVARI, S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther cultures. **Annales Agriculturae fenniae**, v. 25, p. 127-133, 1986c.
- SORVARI, S.; SCHIEDER, O. Influence of sucrose and melibiose on barley anther cultures in starch media. **Plant Breeding**, Berlin, v. 99, p. 164-171, 1987.
- SORVARI, S.; TOLDI, O.; AHANEN, K.; VIINAMÄKI, T.; HAKONEN, T.; TAHVONEN, R. Using polysaccharides and galactomannans as gelling agents in capsule formation of artificial seeds. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 122, n. 6, p. 878-883, 1997.
- SOUSA F. B. **Plantas forrageiras para o semi-árido**. Disponível em: <http://www.caprtec.com.br/art32html>> Acesso em: 02 jun. 2004.
- SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting in vitro in difficult-to-propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters**, v. 24, p. 1-9, 1982.
- SRISKANDARAJAH, S.; SKIRVIN, R. M.; ABU-QAoud, H. The effects of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, p. 185-189, 1990.
- STANLEY, N. F. Agars. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their aplications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 187-204.
- STOLARZ, A.; MACEWICZ, J.; LÖRZ, H. Direct somatic embriogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 137, p. 347-357, 1991.
- STOLZ, L. P. Agar restriction of the growth of excised mature *Iris* embryos. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 96, p. 618-684, 1971.
- SUDHAKAR, V.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Starch-galactomannan interactions: functionality and rheological aspects. **Food Chemistry**, Great Britain, v. 55, p. 259-264, 1996.
- TAKABE, I.; LABIB, G.; MELCHERS, G. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 58, p. 318-320, 1971.
- TAKO, M.; NAKAMURA, S. Synergistic interaction between agarose and D-galacto-D-mannan in aqueous media. **J. Agric. Biol. Chem.**, v. 52, p. 1071-1072, 1988.

TAVARES, G. A. **Estrutura e propriedades da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa* Willd. (cássia)**. Curitiba, 1994. 80 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Disponível em: <http://www.Redbio.org//simposios/s06/Joao%20Batista%20Teixeira/palestra> > Acesso em: 02 jun. 2004.

TENNECO CHEMICALS, INC., Fath, J.; Rosen, M. **Aqueous surface-coating compositions containing hydroxyalkyl ethers of galactomannan gums as thickeners**. Int. Cl. 260-17.4ST; C 08dg. U.S n. 3,700,612. 24 Oct 1970, Appl. 156,050, 23 Jun 1971; 3 pp. **Chemical Abstract**, v. 78, n. 10, p. 77 (59856x), mar. 1973.

TESSARIOLI NETO, J.; ORTIGOZA, L. E. R.; VERDIAL, M. F. Produção de mudas de cultivares de morangueiro em duas épocas de colheita. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 231-233, jun. 2003.

THE WORLD APPLE REPORT. **Maçã – Ranking de competitividade Principais países fornecedores de maçã**, v. 11, n. 2, 2004.

THORPE, T. A. Callus organization and *de novo* formation of shoots, roots and embryos *in vitro*. In: TOMES, B. T.; ELLIS, B. E.; HARNEY, P. M. **Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry**. Ghelph: University of Guelph, 1982. p. 115-138.

THORPE, T. A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I. K. and THORPE, T. A. **Plant Cell and Tissue Culture**. New York: Kluwer Academic Publisher, 1994.

TITEL, C.; EHWALD, R.; ZOGLAUER, K.; HELLMIG, A. A parenchymatic medium solidifier for plant *in vitro* culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 6, p. 473-475, 1987.

TOLSTOGUZOV, V. B. e BRAUDO, E. E. Fabricated foodstuffs as multicomponent gels. **Journal Texture studies**, Auckland, v. 14, p. 183-212, 1983.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v. 1. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1998. p. 11-20.

TORREY, J. G. Differential mitotic response of diploid and polyploid nucleoid to auxin and kinetin treatment. **Science**, New York, v. 128, p. 1148, 1958.

TORREY, J. G. The development of plant biotechnology. **Ann. Sci.**, v. 73, p. 354-363, 1985.

TURQUOIS, T.; DOUBLIER, J-L.; TARAVEL, F-R.; ROCHAS, C. Synergy of the *K*-carrageenan-carob galactomannan blend inferred from rheological studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Shannon, v. 16, n.2, p. 105-107, 1994.

TURQUOIS, T.; TARAVEL, F. R.; ROCHAS, C. Synergy of the agarose-carob galactomannan blend inferred from NMR and rheological studies. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 238, p. 27-38, 1993.

VAGENS MADURAS E SEMENTES DE *Cyamopsis tetragonolobus*. Disponível em: [www.texturantsystems.com/texturant/html/e/productos/guar.htm](http://www.texturantsystems.com/texturant/html/e/productos/guar.htm)> Acesso em: 02 jun 2004.

VARGAS-RECHIA, C. G.; SIERAKOWSKI, M.-R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Polysaccharides from the seeds of *Senna multijuga*. **International Journal of Macromolecules**, v. 17, p. 409-413, 1995.

VASIL, V.; HILDEBRANDT, A. C. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microculture. **Science**, New York, v.150, p. 889-892, 1965.

VASIL, I. K.; VASIL, V. Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Oxon, v. 8, p.117-127, 1972.

VIEBKE, C.; PICULELL, L. Adsorption of galactomannans onto agarose. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 29, n.1, p. 1-5, 1992.

WISEUR, J. Micropropagation of pear, *Pyrus communis* L., in a double-phase culture medium. **Acta Horticulturae**, New York, v. 212, p. 117-124, 1987.

WALTER, R. H. **Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food**. London: Academic Press, 1998. 236 p.

WARD, F. M.; ANDON, S. A. Water-soluble gums used in snack foods and cereal products. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 38, n. 10, p. 748-752, 1993.

WERBROUCK, S. P. O.; DEBERGH, P. C. Applied aspects of plant regeneration – Micropropagation. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.). **Plant Cell Culture**. New York: Oxford University Press, 1994. p. 127-135.

WERNER, E. M.; BOE, A. A. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. **Hortscience**, Alexandria, v. 15, n. 4, p. 509-510, 1980.

WHISTLER, R. L.; SMART, L. C. **Polysaccharide Chemistry**. New York: Academic Press, 1953. 493 p.

WHISTLER, R.; HYMOWITZ, E. **Guar: agronomy, production, industrial use, and nutrition**. Lafayette: Purdue University Press, 1979.

WHITE, P. R., Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, Rockville, v. 9, p. 585-600, 1934.

WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. **American Journal of Botany**, New York, v. 26, p. 59-64, 1939.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and na improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, v. 7, p. 53-65, 1943.

WILLIAMS, R. R.; TAJI, A. M. Effects of temperature, darkness and gelling agent on long-term storage of *in vitro* shoot cultures of australian woody plant species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 11, p. 151-156, 1987.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L. (Ed.). **Methods in carbohydrate chemistry 2**. New York: Academic Press, 1963a. p. 65-68.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L. (Ed.). **Methods in carbohydrate chemistry 2**. New York: Academic Press, 1963b. p. 211-215.

WOLTER, K.; SKOOG, F. Nutritional requirements of *Fraxinus* callus cultures. **American Journal of Botany**, New York, v. 53, p. 263-269, 1966.

WYATT, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 272, p. 1-40, 1993.

YALPANI, M.; SANDFORD, P. A. Comercial polysaccharides: recent trends and developments. In: YALPANI, M. **Industrial polysaccharides: genetic engineering, struture, property relations and aplications**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987. p. 311-335.

YEO, D. Y.; REED, B. M. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks. **Hortscience**, v. 30, n. 3, p. 620-623, 1995.

ZAMORA, A. B.; SCOTT, K. J. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. **Plant Science Letters**, Clare, v. 29, p. 183-189, 1983.

ZANOL, G. C.; FORTES, G. R. L.; CAMPOS, A. D.; SILVA, J. B.; CENTELLAS, A. Q. Enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase do porta-enxerto de macieira Marubakaido tratado com ácido indolbutírico e floroglucinol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 1, p. 65-68, 1998.

ZANOL, G. C.; FORTES, G. R. L.; CAMPOS, A. D.; SILVA, J. B.; CENTELLAS, A. Q.; MULLER, N. T.; GOTTINARI, R. A. Escuro e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 3, n. 1, p. 23-30, 1997.

ZAWADSKI-BAGGIO, S. **Arabinana e galactomanana de *Schizolobium parahybum*. Estudo da biossíntese de galactomanana**. Curitiba, 1994. 149 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ZAWADSKI-BAGGIO, S. F.; SIERAKOWSKI, M.-R.; CORRÊA, J. B. C.; REICHER, F. A linear (1→5)-linked  $\alpha$ -L-arabinofuran from the seeds of guapuruvu (*Schizolobium parahybum*). **Carbohydrate Research**, v. 233, p. 265-269, 1992.

ZENKTELER, M. A. *In vitro* formation of plants from leaves of several species of the Solanaceas family. **Biochem. Physiol. Pflanz.**, v. 613, p. 509-512, 1972.

ZHAN, D. F.; RIDOUT, M. J.; BROWNSEY, G. J.. MORRIS, V. J. Xanthan-locust bean interactions and gelation. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 21, p. 53-58, 1993.

ZILLER, S. R. Disponível em: [http://www.institutohorus.org.br/download/fotos/le\\_leucocephala/leucocephala02.htm](http://www.institutohorus.org.br/download/fotos/le_leucocephala/leucocephala02.htm)> Acesso em: 02 jun. 2004.



ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of fruits plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 120, p. 217-222, 1981.

ZIMMERMAN, R. H. Apple. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of Plant Cell Culture**. New york: MacMillan, 1984, v. 2. p.369-393.

ZIMMERMAN, R. H.; BHARDWAJ, S. V.; FORDHAM, I. M. Use of starch-gelled medium for tissue of some fruit crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, p. 207-213, 1995.